

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de stress oxydatifs sublétaux et de stimulations cytokiniques sur la sénescence répliquative et rôle du métabolisme calcique sur la survie cellulaire lors de stress cytotoxiques

Balbeur, Laura

Award date:
1998

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**Effets de stress oxydatifs sublétaux et de stimulations cytokiniques sur
la sénescence répllicative et rôle du métabolisme calcique sur la
survie cellulaire lors de stress cytotoxiques**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

Laura BALBEUR

Juin 1998

FMB 4/1998/2

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FMB

4/1998/2

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

12 JUIN 1998

Faculté des Sciences

Effets de stress oxydatifs sublétaux et de stimulations cytokiniques sur la sénescence répllicative et rôle du métabolisme calcique sur la survie cellulaire lors de stress cytotoxiques

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

Laura BALBEUR

Juin 1998

UBS 7846046

340468

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet @fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Effets de stress oxydatifs sublétaux et de stimulations cytokiniques sur
la sénescence répllicative et rôle du métabolisme calcique sur la
survie cellulaire lors de stress cytotoxiques**

BALBEUR Laura

Résumé

Dans ce travail, nous avons premièrement réalisé une comparaison de l'effet de stress oxydatifs sublétaux au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) et de stimulations cytokiniques sur le vieillissement cellulaire *in vitro*. Nous en concluons que les cytokines testées provoquent un effet de vieillissement accéléré, quoiqu'inférieur à celui des stress sublétaux au *t*-BHP, sur base de deux critères de vieillissement *in vitro*.

D'autre part, nous avons étudié le rôle du calcium extracellulaire et intracellulaire sur la résistance aux stress oxydatifs au *t*-BHP à des concentrations cytotoxiques. Nous trouvons, à certaines concentrations en *t*-BHP, un effet protecteur de la chélation de calcium intracellulaire et de l'entrée de calcium dans les mitochondries. Nous confirmons les effets protecteurs du D-glucose qui, dans ces conditions de stress, permet une meilleure survie cellulaire. Ce travail ouvre la voie à des mesures poussées des concentrations calciques intracytoplasmique et intramitochondriale pour mieux comprendre ces effets protecteurs.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

Promoteur: J.Remacle

Directeur de mémoire: O.Toussaint

Mes premiers et très sincères remerciements vont au sympathique Professeur José Remacle, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie mes lecteurs: madame Michèle Cornet, le Professeur Piront et messieurs Trausch et Masereel.

Je remercie également de tout coeur Olivier Toussaint, mon guide à la réflexion précieux tout au long de cette démarche scientifique.

Merci au Professeur C. Richter de Zürich, qui nous a fourni la cyclosporine et au Professeur P. Devos, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire afin de réaliser les lectures au spectrophotomètre...

Parmi tous ceux du laboratoire, je remercie particulièrement Andrée pour m'avoir appris les bases indispensables de la culture cellulaire, ainsi que François pour tout le travail qu'il fournit chaque jour pour nous sous les hottes (merci également à Nathalie!). Je le remercie aussi pour son aide précieuse pour moi.

J'adresse un tout grand merci aux GRAS pour leur aide, leur disponibilité et l'ambiance qui régnait au bureau.

Pat pour ses bons conseils, et pour m'avoir aidée à éteindre le feu que j'avais mis à la hotte...

Tcherry pour m'avoir grandement guidée, parfois supplée face à l'écran et pour m'avoir appris que son kiné est coiffeur de formation...

Jean-Jean pour son aide précieuse dans la mise au point du test β -gal et sa patience...

Parmi tous ceux du labo, je tiens encore à remercier plus particulièrement Marc Dieu pour sa sympathie et sa patience... et Dieu sait qu'il n'a pas tous les jours facile avec les "cas informatiques"!

Un chaleureux merci à Vincianne et Sébastien pour les dosages de protéines... Sylvie pour la biblio... Steph, Isa R. pour l'aide à la rédac'.

Enfin, merci, merci à tous pour votre bonne humeur.

"On met aussi de son coeur dans un mémoire" m'a dit l'autre jour un grand barbu à lunettes (qui d'ailleurs a un numéro de téléphone qui ressemble beaucoup trop à celui de l'équipe vieillissement à mon goût...).
C'est pour cela que je remercie encore plus que tous, tous ceux que je côtoie chaque jour et qui me soutiennent:

Anne et Delphine pour les interminables rigolades au Pukkel, ailleurs et toujours, les carottes râpées gonflap', Albègue Delaire, le pâté en croûte, Michael Jackson et les Brésiliens...

Sophie pour sa bonne humeur et ses (nos?) super bons plans...

Jess, mon parrain, unique et préféré entre tous, qui est toujours là pour m'aider d'une façon ou d'une autre.

Bibice qui me poursuit depuis... au moins ça, et sa copine Mu.

Tous les copains de Namur et d'ailleurs.

Maman qui a toujours fait le maximum pour moi même si ça n'a pas été facile...

Et aussi:

Le Professeur Carol Sibley de l'université de washington à Seattle pour ses encouragements.

Monsieur André Martiniv, qui m'a donné goût à la bio.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
U.V.	Ultra violet
MF	Fibroblaste mitotique
PMF	Fibroblaste post-mitotique
SA- β -gal	Senescence-associated β -galactosidase activity
tBHP	tert-butylhydroperoxyde
IL-1	Interleukine-1
TNF	Tumor necrosis factor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
MAPK	Mitogen activated protein kinase
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NADPH	Nicotinamide adénosine phosphate
NADH	Nicotinamide adénosine
ADP	Adénosine diphosphate
CSA	Cyclosporine A
PPIase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
BME	Based medium Eagle's
SB	Sérum bovin
DMSO	Diméthyl sulfoxide
HBSS	Hank's balanced salt solution
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'- tétraacétique
BAPTA-AM	Acide 1,2bis(2-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique tétrakis(acétoxyméthyl ester)
PBS	Phosphate buffer saline
D.O.	Densité optique
NAC	N-acétyl-L-cystéine
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium

I. INTRODUCTION

1. Les théories du vieillissement cellulaire.

1.1. Lois déterministes ou stochastiques: prudence terminologique.

1.2. Les théories génétiques.

1.2.1. Théories génétiques et déterministes.

1.2.2. Théories génétiques et stochastiques.

1.2.2.1. Théorie de la régulation génique.

1.2.2.2. Théories de la différenciation terminale et de l'association de gènes au vieillissement.

1.2.2.3. Théorie de l'instabilité du génome.

1.3. Les théories environnementales.

1.3.1. Une théorie d'intérêt historique: l'erreur catastrophique.

1.3.2. La théorie des radicaux libres.

2. Thermodynamique et vieillissement.

2.1. La cellule comme système thermodynamique.

2.2. Effet des stress: point de vue de la thermodynamique des systèmes ouverts.

3. Application expérimentale de la théorie thermodynamique du vieillissement cellulaire.

3.1. Modèle d'étude du vieillissement cellulaire.

3.1.1. Modèle d'étude: la sénescence répllicative des fibroblastes humains.

3.1.2. Intérêt de l'étude du vieillissement à partir d'un modèle *in vitro*.

3.1.3. Caractéristiques morphologiques et histochimiques des cellules sénescents.

3.1.3.1 Evolution morphologique des fibroblastes au cours du vieillissement *in vitro*.

3.1.3.2. Un biomarqueur des cellules humaines sénescents en culture: l'activité β -galactosidase associée au vieillissement.

3.2. Effets des stress oxydatifs sublétaux sur le vieillissement cellulaire.

3.2.1. Modèle de stress oxydatif au tert-butylhydroperoxyde

3.2.2. Effet des stress sur les biomarqueurs du vieillissement *in vitro*.

3.2.3. Les stimulations aux cytokines comme l'IL-1 et le TNF- α jouent un rôle dans la progression d'une population de cellules vers des morphotypes âgés.

4. Rôle du métabolisme énergétique dans la résistance aux stress.

5. Etude du métabolisme du calcium lors des stress.

5.1. Le métabolisme calcique mitochondrial.

5.2. L'activation et le rôle de la phospholipase A_2 en rapport avec le métabolisme calcique.

5.2.1. La PLA_2 : généralités.

5.2.2. L'activation de la forme cytosolique de la PLA_2 par le calcium.

5.2.3. Les effets de la PLA_2 .

5.2.4. Les inhibiteurs de la PLA_2 .

II. OBJECTIFS

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture de fibroblastes.

1.1. Matériels.

1.2. Méthodes

1.2.1. Repiquage de cellules.

1.2.2. Congélation des cellules.

1.2.3. Décongélation des cellules.

2. Test de cytotoxicité.

2.1. Etude de l'effet cytotoxique de stress cellulaires.

2.1.1 Matériels.

2.1.2 Méthodes.

2.2. Etude du rôle du métabolisme du calcium dans la cytotoxicité des stress au tBHP.

2.2.1. Matériels.

2.2.2. Méthodes.

2.3. Mesure de la toxicité par dosage de protéines.

2.3.1. Matériels.

2.3.2 Méthodes.

3. Les stress et stimulations cellulaires et leurs conséquences sur les biomarqueurs du vieillissement.

3.1. Stress successifs.

3.1.1. Matériels.

3.1.2. Méthodes.

3.2. Effets de la composition du milieu de stress.

3.2.1. Matériels.

3.2.2. Méthodes.

3.3. Mesure de l'effet des stress successifs et de la composition du milieu sur le vieillissement accéléré en se référant au biomarqueur SA β -gal.

3.3.1. Matériels.

3.3.2. Méthodes.

3.4. Le vieillissement accéléré et le biomarqueur SA β -gal détecté par une coloration en puits lisible au spectrophotomètre.

3.4.1. Matériels.

3.4.2. Méthodes.

3.5. Effet des stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1.

3.5.1. Matériels.

3.5.2. Méthodes.

3.6. Mesure de l'effet de stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1 sur le vieillissement accéléré par détermination des morphotypes.

3.6.1. Matériels.

3.6.2. Méthodes.

3.7. Effets de la présence d'un anti-oxydant lors de stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1.

3.7.1. Matériels.

3.7.2. Méthodes.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Etude du vieillissement accéléré.

1.1. Effet de stimulations successives par des cytokines sur les biomarqueurs du vieillissement.

1.1.1. Stimulations au TNF- α et à l'IL-1.

1.1.1.1. Effets sur le biomarqueur « morphotypes ».

1.1.1.2. Discussion.

1.1.1.3. Effets sur l'activité β -galactosidase liée à la sénescence (SA β -gal).

1.1.1.4. Discussion.

1.1.2. Effet de l'addition d'un composé antioxydant lors de stimulations au TNF- α et à l'IL-1 α .

1.1.2.1. Effets sur le biomarqueur « morphotypes ».

1.1.2.2. Discussion.

1.1.2.3. Effets sur le biomarqueur « SA β -gal ».

1.1.2.4. Discussion.

1.2. Effet de stress successifs au tBHP sur les biomarqueurs du vieillissement.

1.2.1. Mise au point préliminaire: détermination de la concentration en tBHP à utiliser.

1.2.1.1. Résultats.

1.2.1.2. Discussion.

1.2.2. Stress au tBHP et SA β -galactosidase.

1.2.2.1. Résultats.

1.2.2.2. Discussion.

2. Etude du rôle du métabolisme calcique en réponse à des stress sous tBHP causant une mortalité cellulaire.

2.1. Effet de l'absence de Ca^{++} dans le milieu de stress.

2.1.1. Stress en présence du chélatant du Ca^{++} .

2.2. Effet de la présence d'un chélatant du Ca^{++} intracellulaire, le BAPTA-AM, dans le milieu de stress.

2.2.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en BAPTA-AM.

2.2.1.1. Résultats.

2.2.1.2. Discussion.

2.2.2. Stress au tBHP en présence de BAPTA-AM et survie cellulaire.

2.2.2.1. Résultats.

2.2.2.2. Discussion.

2.3. Etude du métabolisme calcique mitochondrial: rôle de la présence d'un inhibiteur de l'uniport de Ca^{++} mitochondrial dans le milieu de stress.

2.3.1. Courbes de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en digitonine et Ruthenium Red.

2.3.2. Stress au tBHP en présence de Ruthenium Red et digitonine et survie cellulaire.

2.3.2.1. Résultats.

2.3.2.2. Discussion.

2.4.1. Courbes de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en thapsigargine.

2.4.2. Stress au tBHP en présence de thapsigargine et survie cellulaire.

2.4.2.1. Résultats.

2.4.2.2. Discussion.

2.5. Etude l'inhibition du relargage du Ca^{++} par la mitochondrie par la cyclosporine A.

2.5.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en cyclosporine A.

2.5.2. Stress au tBHP en présence de cyclosporine A et survie cellulaire.

2.5.2.1. Résultats.

2.5.2.2. Discussion.

2.5.3. Stress au tBHP avec préincubation de cyclosporine A et survie cellulaire.

2.5.3.1. Résultats.

2.5.3.2. Discussion.

2.6. Etude du rôle de l'activation de la PLA₂ par le calcium au moyen d'un inhibiteur placé dans le milieu de stress.

2.6.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en trifluoperazine.

2.6.2. Stress au tBHP avec préincubation de trifluoperazine et survie cellulaire.

2.6.2.1. Résultats.

2.6.2.2. Discussion.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI. BIBLIOGRAPHIE

I. INTRODUCTION

Théories génétiques		Théories environnementales
Théories déterministes	Théories stochastiques	Théories stochastiques
	altérations du génome en particulier	altérations des constituants cellulaires en général
Exemples de théories	Exemples de théories	Exemples de théories
<u>- Activation d'un programme</u> Effets directs d'hormones ou de facteurs neuronaux sur l'activation du programme	<u>- Régulation génique</u> Niveau = d'expression des gènes de réparation et de défense <u>- Différenciation terminale</u> <u>- Instabilité du génome</u>	<u>- Théorie généralisée de l'erreur catastrophique</u> - Radicaux libres - Accumulation de déchets métaboliques (ex : lipofuchine) - Augmentation du niveau des modifications dues aux diverses perturbations (T°, pH, force osmotique, hypoxie, molécules toxiques) encourues pendant la vie cellulaire
<u>- Gènes spécifiques de vieillissement</u> Expression différentielle de gènes chez les cellules jeunes ou vieilles		

Figure I-1. Tableau récapitulatif des différentes théories du vieillissement cellulaire.

Dans cette introduction, nous passerons brièvement en revue les principales théories du vieillissement de manière à pouvoir décrire rapidement la théorie du vieillissement basée sur la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre. Nous montrerons ensuite comment cette théorie permet de prévoir d'une part que les stress non létaux peuvent faire vieillir les cellules de manière accélérée. D'autre part, ce modèle prévoit que l'intensité du métabolisme énergétique est un facteur déterminant dans la résistance des cellules au vieillissement accéléré en cas de stress non létaux et dans la survie cellulaire lors de stress létaux.

Nous décrirons ensuite les expériences et les résultats expérimentaux découlant de ce modèle théorique et obtenus sur des cultures de fibroblastes humains normaux.

1. Les théories du vieillissement cellulaire (figure I-1.).

Une revue non exhaustive de la littérature révèle de multiples théories du vieillissement. Le mode de classement le plus intéressant pour les théories du vieillissement est un classement selon la nature et l'origine des mécanismes qui y conduisent.

1.1. Lois déterministes ou stochastiques: prudence terminologique.

Un phénomène est régi par des lois stochastiques s'il comporte des variables aléatoires qui font que ce phénomène est en partie le fruit du hasard et doit être étudié en faisant appel à des calculs probabilistes.

A l'opposé, un phénomène est régi par des lois déterministes si un nombre limité de variables connues permettent de le décrire et évoluent exactement de la même manière à chaque reproduction du phénomène considéré, sans faire appel à aucun calcul probabiliste.

Dans le cadre des théories du vieillissement, les termes "génétique" et "déterministe" ne peuvent pas être confondus. Cependant, nous assimilerons ici le terme "déterministe" au terme "programmé".

Considérons tout d'abord les théories génétiques.

1.2. Les théories génétiques.

1.2.1. Théories génétiques et déterministes.

Pour que le vieillissement s'explique par des théories génétiques et déterministes, il doit exister un nombre restreint de gènes présents au cours de la vie d'une cellule et régissant le phénomène de vieillissement. Ces gènes doivent être impliqués dans un mécanisme d'activation/répression séquentielle d'autres gènes, qui entraînent à un moment précis la mise en marche du processus de vieillissement de la cellule.

En particulier, parmi ces théories génétiques et déterministes, on retrouve celle de l'activation d'un programme après la période de reproduction ou après une modification environnementale chez certains animaux et faisant intervenir des hormones ou des facteurs neuronaux (Kirkwood, T.B.L. et Cremer, T., 1982).

1.2.2. Théories génétiques et stochastiques.

1.2.2.1. Théorie de la régulation génique.

Outre l'existence de gènes très régulés qui assurent le développement et la reproduction par une activation/répression séquentielle, un effet modulateur des facteurs extérieurs est à prendre en compte.

Selon Kanungo, la durée de la phase de reproduction dépend de la capacité de défense de l'organisme face à certains facteurs néfastes. Ces facteurs, comme des altérations physico-chimiques du génome, sont dus à des modifications du métabolisme qui peuvent allumer certains gènes indésirables ou affecter l'action de gènes essentiels. Pour Kanungo, le vieillissement n'est donc pas déterministe puisqu'il n'est pas dû à des gènes spécifiques ayant évolué pour la cause et qui s'allumeraient après une certaine durée de phase de reproduction (Kanungo, M.S., 1980).

1.2.2.2. Théories de la différenciation terminale et de l'association de gènes au vieillissement.

Alors que Kanungo mettait l'accent sur une variation des interactions protéines-ADN due à une modification du métabolisme général marquant la

fin de la phase de reproduction, Cutler propose que ces modifications de la régulation génique sont dues en partie aux effets pervers du métabolisme et notamment du métabolisme de l'oxygène, source de radicaux libres. C'est à partir de cette idée qu'il a introduit le terme de "dysrégulation" comme cause du vieillissement cellulaire: des modifications de l'expression génique qui entraînent une différenciation terminale des cellules. Des arguments expérimentaux suggèrent que le taux métabolique spécifique (exprimé en kilocalories par gramme de tissu par jour) est inversement proportionnel à la longévité des espèces de mammifères. Les travaux de Cutler font penser qu'il existe une relation directe entre ce taux métabolique spécifique et la production de radicaux libres (Cutler, R.G., 1985) (pour une revue, voir Cutler, R.G., 1991).

Les moyens de défense des organismes face aux radicaux libres sont également à prendre en compte. L'idée qui en découle est que plus la régulation des gènes permet une lutte efficace contre les radicaux libres, plus une espèce aura une longévité importante. Cette idée peut être étendue à tous les systèmes de défense, de réparation, ou d'élimination des dommages.

Cette théorie est stochastique dans sa nature: il existe une multitude de combinaisons possibles de dysrégulations géniques conduisant finalement à la destruction du système cellulaire.

1.2.2.3. Théorie de l'instabilité du génome. (pour une revue, voir Slagboom, P.E. et Vijg, J., 1989)

L'exposition de l'ADN au simple effet de la température ambiante a des conséquences sur sa stabilité, comme c'est le cas de toute molécule chimique. L'ADN est exposé aux radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire et produits notamment par la respiration mitochondriale; ces réactifs peuvent causer des modifications chimiques dans les bases nucléotidiques et conduire à des mutations.

S'il existe toute une panoplie d'enzymes de réparation de l'ADN, ces modifications ne sont cependant pas toutes réparées.

Ces théories génétiques et stochastiques donnent donc à l'environnement cellulaire une part importante: réaliser des dommages au hasard dans l'ADN, considéré comme étant le noeud principal du phénomène.

1.3. Les théories environnementales.

Elles sont basées sur l'évidence que l'environnement peut agir sur divers constituants cellulaires, autres que le génome. Ces théories sont toutes stochastiques.

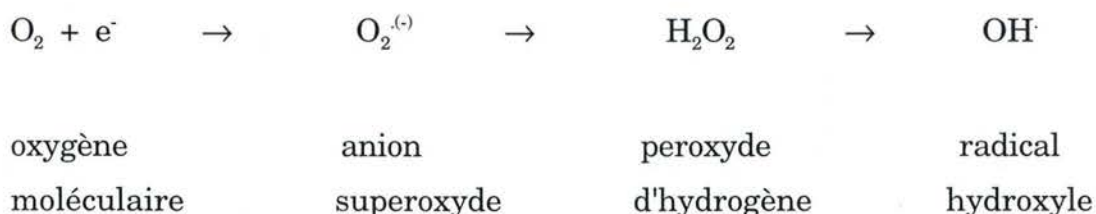
1.3.1. Une théorie d'intérêt historique: l'erreur catastrophique.

Emise par Orgel en 1963 (Orgel, L.E., 1963), elle soutenait qu'une erreur survenant au hasard dans la machinerie traductionnelle peut engendrer des erreurs dans la synthèse de nouvelles protéines. Par là même, si elle n'est pas corrigée, elle peut s'amplifier et devenir incontrôlable. Il s'agit d'une catastrophe au niveau du fonctionnement cellulaire.

Vu le manque d'arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse, Orgel a ensuite élaboré, sous le nom de théorie généralisée de l'erreur catastrophique (Orgel, L.E., 1973), une théorie regroupant tous les mécanismes responsables de la dégradation cellulaire: altérations de l'ADN mitochondrial et nucléaire, du métabolisme énergétique, peroxydation lipidique des membranes, etc. Cette théorie regroupe toutes les théories stochastiques du vieillissement cellulaire, qu'elles soient génétiques ou non.

1.3.2. La théorie des radicaux libres (Harman, D., 1956; Harman, D., 1998; Poot, M., 1991).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques dont au moins un atome contient un électron non apparié sur son orbitale externe. Cette particularité rend ces molécules très réactionnelles. Les radicaux libres sont dans la plupart des cas dérivés de l'oxygène moléculaire.



La respiration mitochondriale est la principale source de radicaux libres dans la cellule. En effet, 2 à 3 % des électrons de la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale interne échappent aux transporteurs d'électrons et sont libérés hors de celle-ci. Ils vont réagir avec l'oxygène et former des radicaux libres suivant la réaction séquentielle illustrée ci-dessus. Ces espèces radicalaires peuvent altérer de nombreux constituants cellulaires: protéines, acides nucléiques, acides gras...

Par ces exemples, on voit bien que la théorie généralisée de l'erreur catastrophique accepte que toute une gamme de phénomènes néfastes liés aux interactions entre la cellule et son environnement peuvent avoir lieu.

Les arguments expérimentaux en faveur de cette théorie suffisent à rejeter l'hypothèse que le vieillissement est totalement programmé. Il faut donc tenir compte à la fois des théories déterministes et stochastiques du vieillissement cellulaire.

Un point de vue opposé semble également intéressant à considérer. En effet, quels sont les mécanismes qui permettent le maintien de la structure et des fonctions cellulaires pendant si longtemps face à ce nombre impressionnant de possibilités d'augmentation du niveau d'erreurs?

L'idée sous-jacente d'une telle réflexion est la nécessité du maintien de l'équilibre entre les altérations diverses et les systèmes de protection mis en oeuvre pour s'y opposer. Il est intéressant de noter qu'une partie significative des ressources métaboliques sert à la synthèse des systèmes de protection (enzymes antioxydantes par exemple), à l'élimination des produits indésirables, à la division cellulaire,... processus qui demandent une consommation importante d'ATP. A partir d'un certain moment, les mécanismes de défense ne sont plus capables d'assurer cet entretien. Un état irréversible est atteint, repris sous le nom de seuil critique d'accumulation d'erreurs, rejoignant dans sa phase finale la théorie généralisée de l'erreur catastrophique (Remacle, J. *et al.*, 1990), (Toussaint, O. *et al.*, 1992).

La question qui se pose alors est de savoir comment les erreurs pourront s'accumuler au cours du vieillissement pour finalement atteindre ce seuil critique. La théorie de la thermodynamique des systèmes ouverts permet de répondre, au moins en partie, à cette question.

2. Thermodynamique et vieillissement. (Toussaint, O. *et al.*, 1991).

2.1. La cellule comme système thermodynamique.

Considérée dans son ensemble, la cellule est un système auto-organisé qui répond à des critères de stabilité particuliers donnés par la thermodynamique des systèmes irréversibles loin de l'équilibre, thermodynamique qui étudie précisément les systèmes ouverts auto-régulés.

Le maintien de ce type de systèmes est dû aux transformations physico-chimiques ou biochimiques qui s'y produisent, donnant lieu à une production d'entropie dont le niveau dépend directement de l'intensité de ces transformations. On peut donc dire que la production d'entropie représente le niveau du métabolisme cellulaire, que l'on peut définir dans ce cas comme l'ensemble des réactions métaboliques de production et d'utilisation d'énergie libre sous toutes ses formes, qu'il s'agisse de nucléotides triphosphates, potentiel rédox, etc. Cette notion de niveau de production d'entropie recouvre la notion d'efficacité métabolique dans la cellule: plus l'efficacité baisse, plus la production d'entropie, tout d'abord interne puis exportée hors du système, va diminuer.

Dans des conditions extérieures aux systèmes stables, la cellule reste à un minimum de production d'entropie. Cependant, la thermodynamique des systèmes ouverts nous apprend qu'il peut exister, pour un même système, divers niveaux de production d'entropie qui représentent des minima, apparaissant suivant les modifications des paramètres internes ou externes au système.

Dans ce sens, la théorie du vieillissement basée sur la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre permet de prévoir ce qui arrive au système cellulaire lorsqu'il est soumis à des variations de paramètres environnementaux, comme un stress ou une stimulation, ou des variations de paramètres internes.

La situation obtenue dans ces conditions serait simple si la cellule était un système proche de l'équilibre: sa production d'entropie augmenterait momentanément pendant que les paramètres internes qui ont été perturbés se

rééquilibrent. Finalement la production d'entropie reviendrait à son équilibre initial. Toutefois, la cellule est un système ouvert loin de l'équilibre, ce qui en fait par la même occasion un système plus complexe, qui ne peut être décrit par des lois linéaires. Que se passe-t-il alors dans ce type de système tel qu'une cellule vivante, lorsqu'il est confronté à des modifications de paramètres internes ou externes?

C'est ce que nous allons discuter dans le point suivant.

2.2. Effet des stress: point de vue de la thermodynamique des systèmes ouverts.

Une modification des conditions environnementales perturbe directement le système qu'est la cellule: ses principales voies métaboliques perdent leur caractère optimisé, donnant lieu à une baisse de leur activité par unité de substrat disponible et par unité de temps, donc à une baisse de leur production d'entropie. Les cellules vont réagir face à cette perte d'optimisation. Ce sont d'abord les mécanismes senseurs de stress qui vont intervenir. Par exemple, il y aura activation de certains facteurs de transcription lors de stress oxydatifs, activation de kinases de réponse aux stress comme les Jun-kinases qui sont activées lorsque les membranes plasmiques sont altérées par un stress U.V. ou osmotique, etc. Ce sont ensuite les mécanismes d'induction de défense via la transcription et la traduction protéique qui se mettent en marche. Enfin, la réparation ou l'élimination des dommages suivies de la néosynthèse des constituants endommagés, comme par exemple la protéolyse des protéines altérées, terminent le processus.

Les critères de stabilité des systèmes ouverts soumis à des fluctuations entrent alors en ligne de compte. Suivant le niveau des dommages générés par la perturbation et selon l'efficacité des systèmes de défense, le système sera capable ou non de revenir à son niveau de départ. S'il en est incapable, soit il va disparaître (mort cellulaire), soit le système va se réorganiser et réoptimiser son fonctionnement malgré un niveau d'erreurs plus élevé. Cela explique que lors d'une perturbation, la cellule va consommer plus d'énergie pour contrecarrer les effets du stress et tenter de revenir à son état de départ.

L'approche thermodynamique des systèmes ouverts comme nous l'avons décrite peut aussi expliquer l'évolution des cellules au cours du temps et en

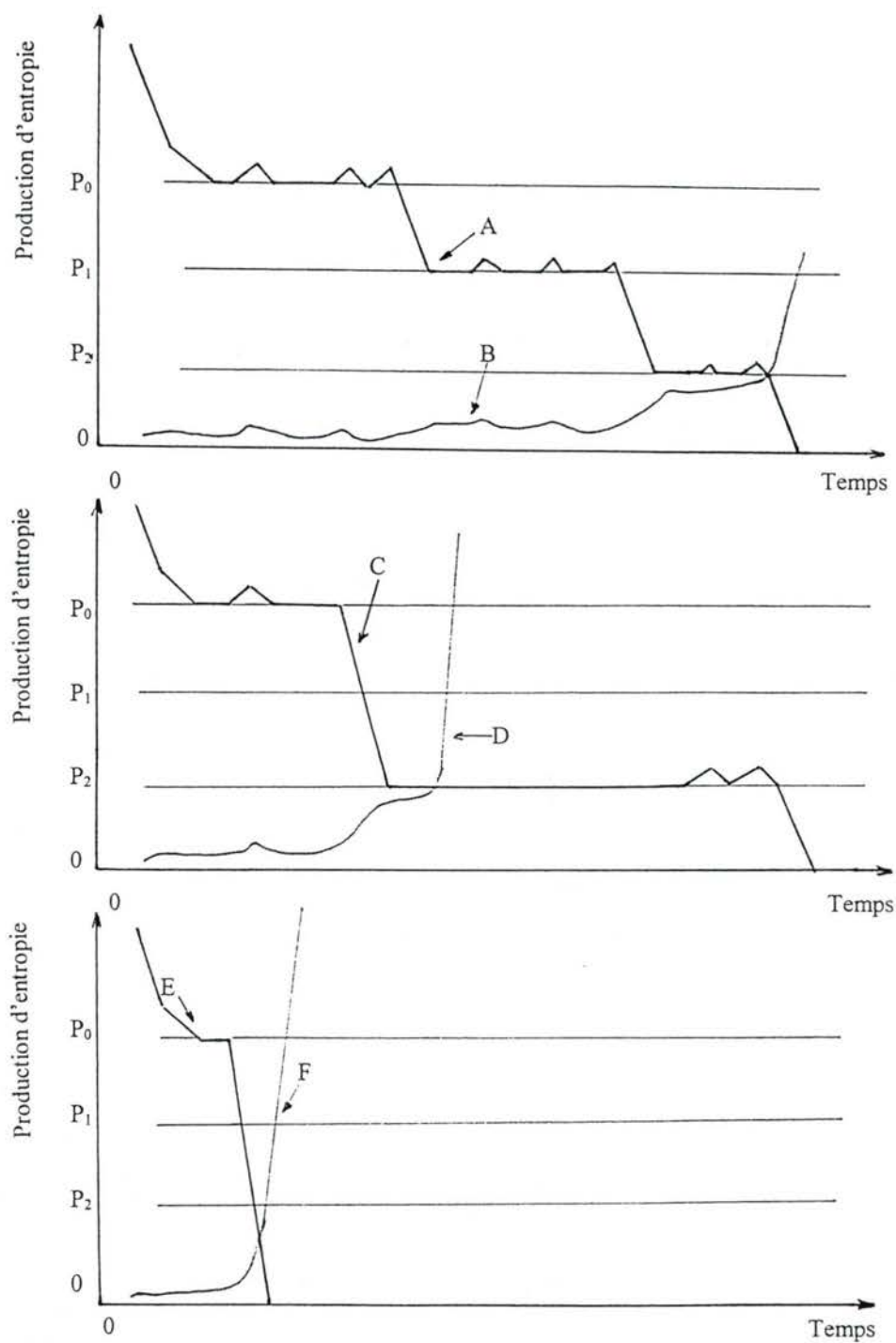


Figure I-2. Evolution de la production d'entropie (A, C et E) et du niveau d'erreurs dans la cellule (B, D et F) suite à des stress d'intensités respectivement faible, intermédiaire et élevée.

particulier l'effet des stress sur certains comportements des cellules, dont leur vieillissement.

La thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre permet de distinguer trois types de stress quant à leur intensité et au type d'effet qu'ils occasionnent dans la cellule (figure I-2.):

1/ les stress omniprésents et de faible intensité. Entrent dans cette catégorie les faibles variations de température, de pH, les excès ou pénuries de nutriments, l'augmentation temporaire de la concentration de radicaux libres endommageant continuellement les constituants cellulaires, etc. Les dégâts engendrés sont sans cesse réparés et le système reste au même niveau de production d'entropie.

2/ les stress d'intensité intermédiaire, qui peuvent être répétés, résultant de situations tout à fait anormales, pouvant refléter certaines conditions pathologiques: inflammation d'un tissu, présence de molécules toxiques, exposition excessive aux U.V., ischémie-reperfusion, etc.

Dans ce cas, les systèmes de défense de la cellule sont dépassés et peuvent être altérés. Il est nécessaire de néosynthétiser certains éléments, comme par exemple des enzymes antioxydantes en cas de stress radicalaires. Une propagation des dommages est possible, notamment par les radicaux libres qui auraient échappé à la destruction par les enzymes antioxydantes. Ils peuvent réagir avec l'ADN et provoquer l'expression d'enzymes nécessaires à la réparation de celui-ci. Ce type de processus est évidemment très coûteux en énergie pour la cellule.

Si le niveau de dommages est élevé, les modifications dues à la perturbation ne sont pas toutes corrigées: on peut alors observer une altération de certains composants structuraux et de certaines fonctions de base ou de régulation de la cellule.

Dans ces conditions, le système ne peut plus se maintenir à son niveau de production d'entropie, qui va alors chuter sous le niveau existant avant la perturbation. La cellule retrouve un nouvel état stationnaire caractérisé par un niveau d'accumulation d'erreurs plus élevé et un niveau d'intensité métabolique plus faible. De ce fait, elle est fragilisée face aux stress ultérieurs.

3/ les stress de forte intensité. La cellule qui subit un tel stress ne parvient pas à retrouver un nouvel état stationnaire car elle est trop endommagée. Elle

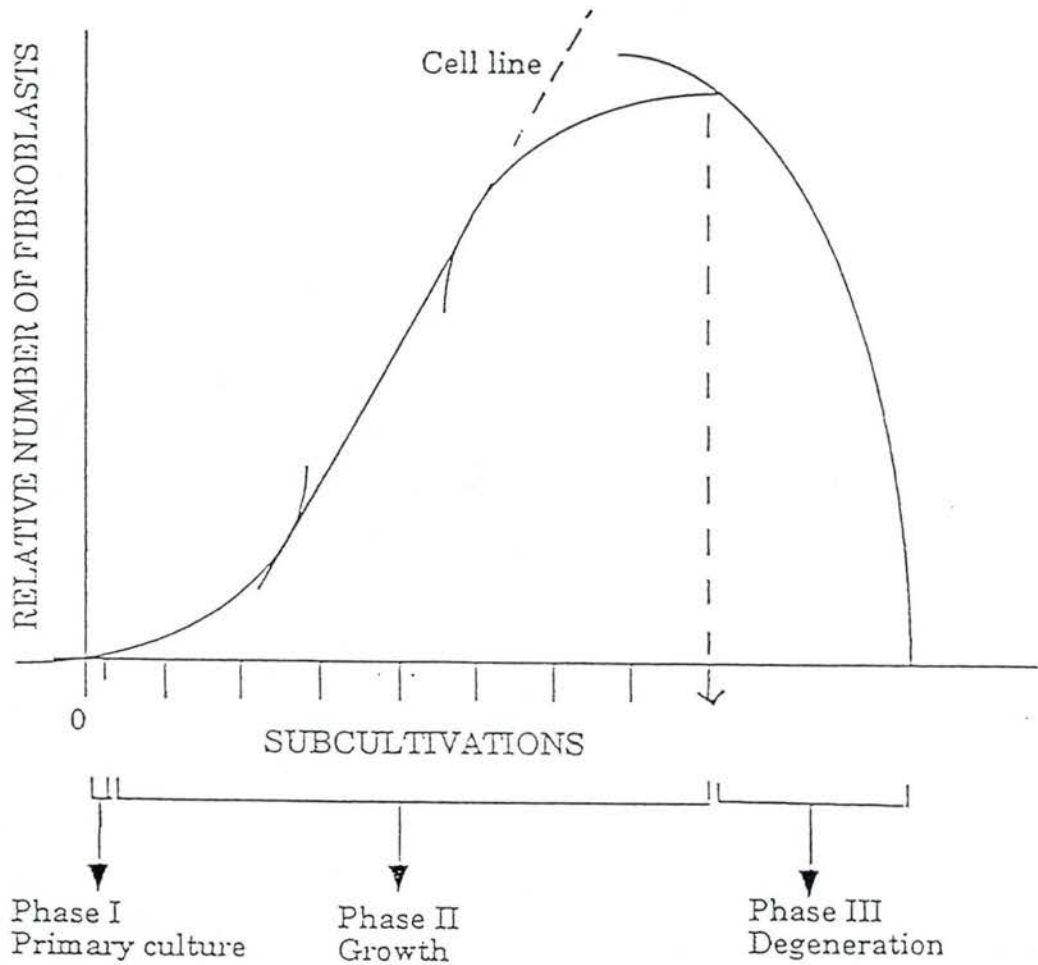


Figure I-3. Illustration du phénomène de sénescence répliquative des cellules en culture. Succession des phases de mise en culture (phase I), prolifération (phase II) et dégénérescence précédant la mort des cellules (phase III).

ne peut plus assurer ses fonctions vitales, son métabolisme chute et sa production d'entropie interne devient nulle. La cellule dégénère et meurt.

3. Application expérimentale de la théorie thermodynamique du vieillissement cellulaire.

3.1. Modèle d'étude du vieillissement cellulaire.

Dans le cadre de l'étude du vieillissement cellulaire *in vitro*, l'approche principale est de déterminer dans quelle mesure les stress peuvent accélérer le processus de vieillissement et affecter la survie cellulaire.

Il s'agit donc d'étudier les effets des stress mais également l'efficacité de certains mécanismes de défense particuliers contribuant à un maintien de l'intégrité du système cellulaire.

3.1.1. Modèle d'étude: la sénescence répllicative des fibroblastes humains (Hayflick, L. et Moorhead, P.S., 1961).

En 1961, Léonard Hayflick et Paul Moorehead ont mis au point le modèle expérimental encore actuellement utilisé pour l'étude du vieillissement. A partir de fibroblastes de poumons d'embryon humain (mort *in utero*) cultivés en conditions stériles, ils ont découvert que le potentiel prolifératif des cellules cultivées *in vitro* était limité. Leur modèle se base sur l'hypothèse que les cellules prolifératives normales sont mortelles et ont donc un nombre fini de divisions potentielles.

Hayflick définit trois phases dans la prolifération des fibroblastes en culture (figure I-3.):

1/ culture primaire: correspondant à la reprise des cellules à partir de l'explant provenant de l'organe donneur. Cette phase est d'autant plus longue que le donneur d'explant est âgé.

2/ croissance: phase pendant laquelle les cellules se divisent activement et effectuent donc un certain nombre de passages en culture. Par exemple, les fibroblastes de poumon humain foetal WI-38 décrits par Hayflick et Moorehead

se divisent une cinquantaine de fois en conditions optimales de culture. On note toutefois un ralentissement de la croissance à partir d'environ 45 doublements de population.

3/ dégénérescence: phase qui fait suite à la phase de croissance. Les cellules arrêtent de se diviser et finissent par mourir.

La phase de déclin de capacité de prolifération est considérée comme étant une manifestation du vieillissement au niveau cellulaire. Il est également à noter qu'il existe une relation inverse entre l'âge du donneur et le nombre de passages en culture *in vitro*.

3.1.2. Intérêt de l'étude du vieillissement à partir d'un modèle *in vitro*.

Les progrès de la biologie du vieillissement ont été permis par l'établissement de cultures de cellules. Ces cultures ont plusieurs avantages:

1/ On cultive un seul type cellulaire à la fois, ce qui permet de démontrer le mécanisme propre au vieillissement de chaque type cellulaire. Par exemple, des types cellulaires expriment certaines protéines bloquant le cycle cellulaire plutôt que d'autres (ex: p21 au lieu de p16, qui bloquent toutes deux le cycle cellulaire mais par des mécanismes distincts).

2/ La découverte d'un mécanisme de blocage des mitoses dans un type cellulaire donné pourrait permettre le blocage des mitoses de cellules cancéreuses issues de ce type cellulaire particulier.

3/ Certains biomarqueurs du vieillissement ayant été découverts *in vitro* ont pu être ensuite détectés *in vivo* alors que ces biomarqueurs n'auraient pas pu être découverts *in vivo*. Par exemple, la découverte de l'activité β -galactosidase liée à la sénescence s'est faite sur des cultures de cellules et a ensuite été détectée dans des coupes de tissu cutané.

4/ La possibilité d'un vieillissement accéléré par des stress a été émise à partir de travaux réalisés *in vitro* dans ce laboratoire. Ainsi, de nombreux biomarqueurs morphologiques, histochimiques, biochimiques et génétiques du vieillissement normal se retrouvent dans les cellules subissant un vieillissement accéléré sous l'effet des stress. Les recherches vont actuellement dans le sens de la détection de ces marqueurs dans des tissus exposés à des stress, comme par exemple la peau exposée à la lumière.

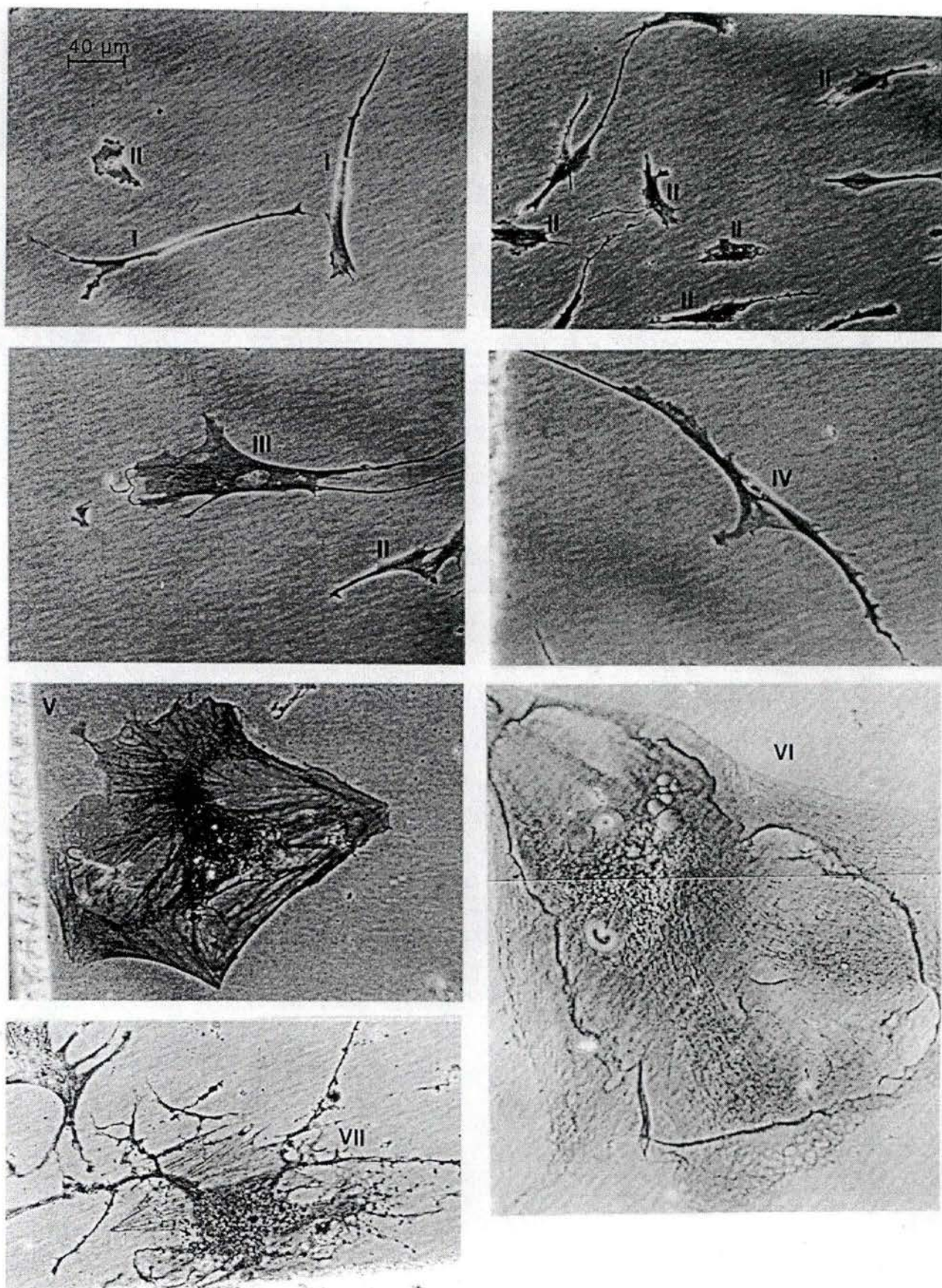


Figure I-4. Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des fibroblastes humains de poumon foetal . (1) fibroblaste mitotique MF I, (2) fibroblaste mitotique MF II, (3) fibroblaste mitotique MF III, (4) fibroblaste post-mitotique PMF IV, (5) fibroblaste post-mitotique PMF V, (6) fibroblaste post-mitotique PMF VI, et (7) fibroblaste dégénératif PMF VII.

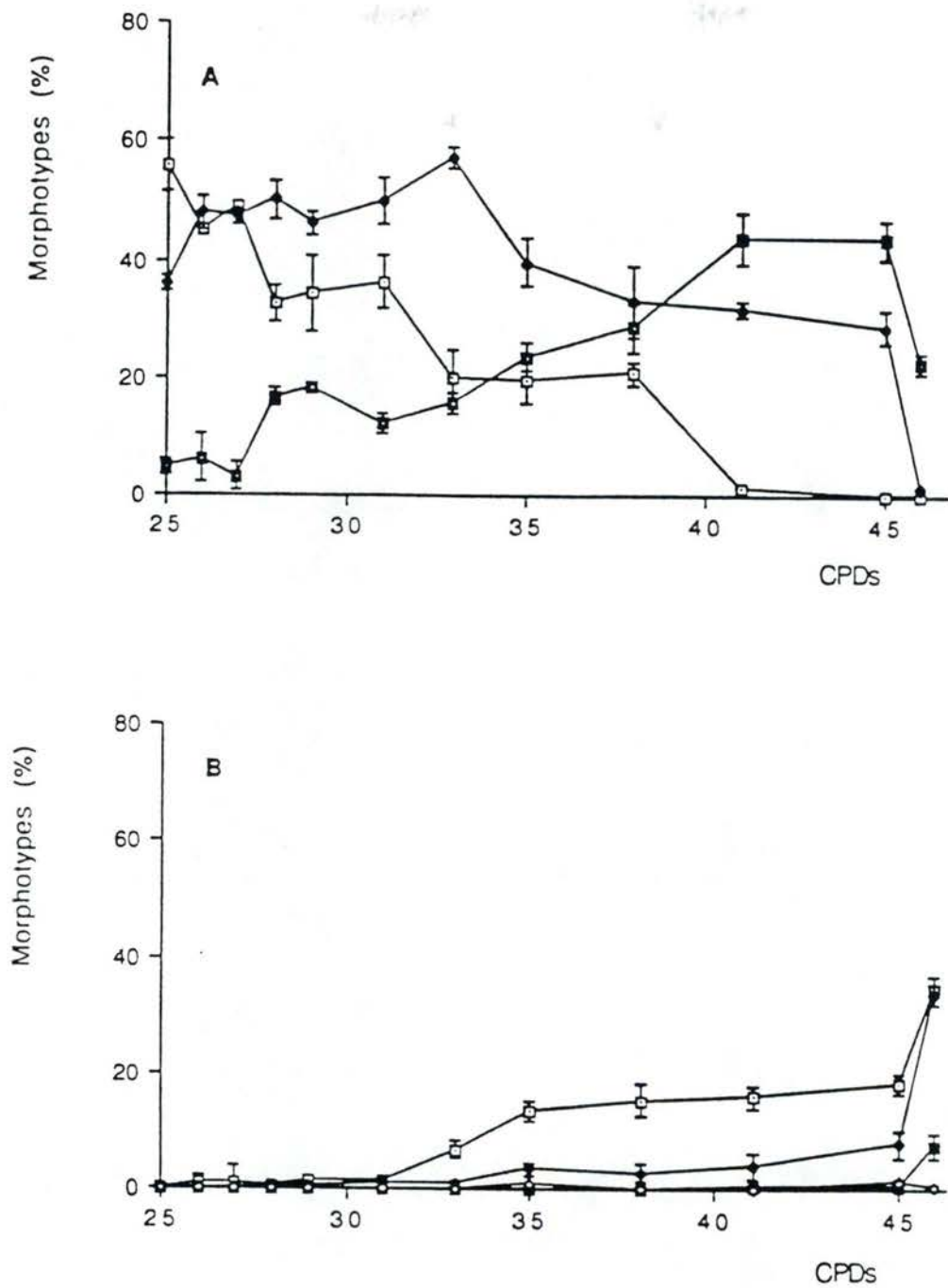


Figure I-5. Proportions des morphotypes des fibroblastes WI-38 en fonction des passages (CPDs). **A.**: morphotypes mitotiques MF I (\square), MF II (\blacktriangle), MF III (\blacksquare). **B.**: morphotypes post-mitotiques PMF IV (\square), PMF V (\blacktriangle), PMF VI (\blacksquare), PMF VII (\diamond). (d'après Toussaint *et al.*, 1992)

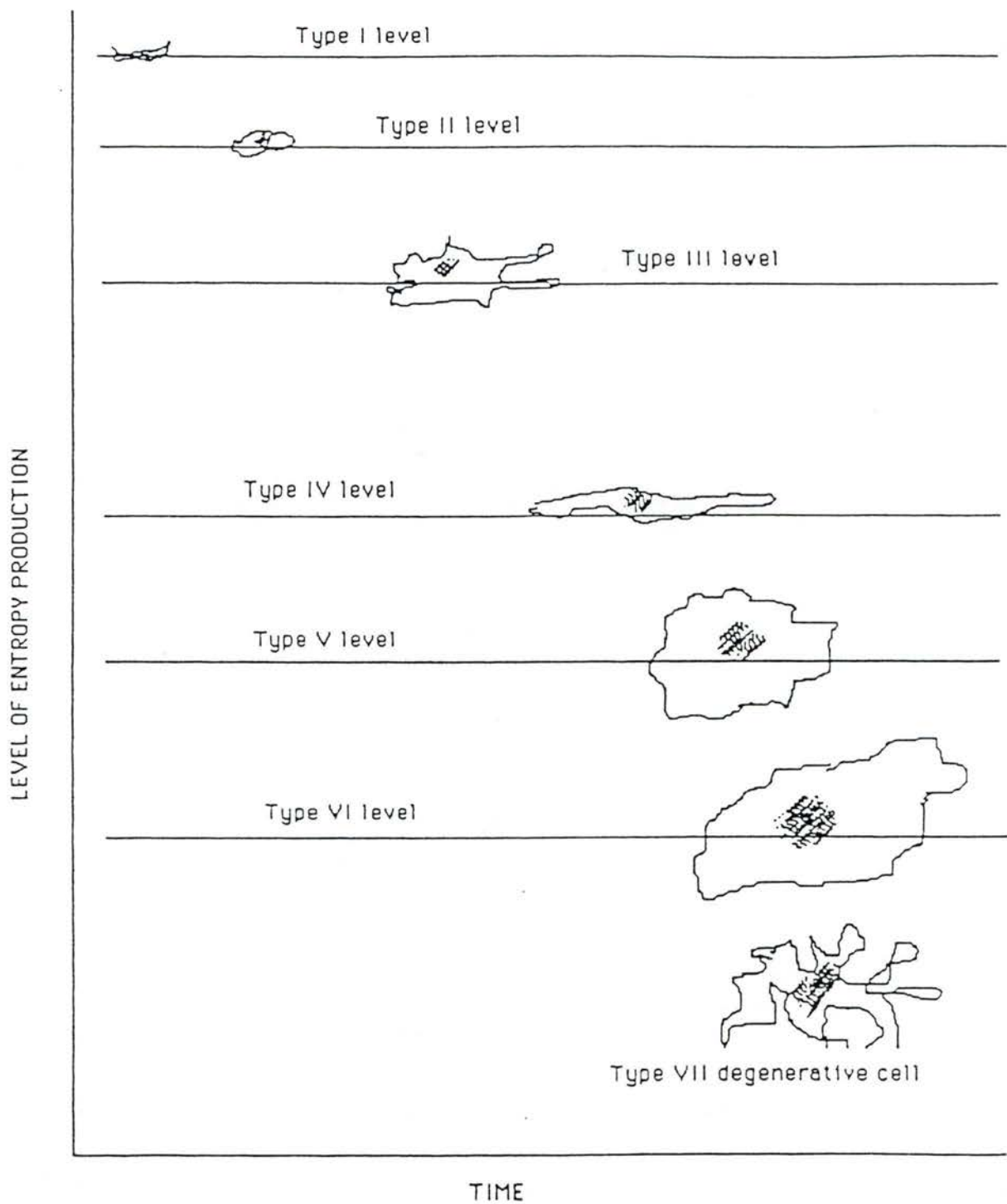


Figure I-6. Représentation schématique de la relation entre niveau de production d'entropie et succession des 7 morphotypes. Le niveau métabolique diminue du morphotype I au morphotype VII.

3.1.3. Caractéristiques morphologiques et histochimiques des cellules sénescences.

3.1.3.1 Evolution morphologique des fibroblastes au cours du vieillissement in vitro.

Bayreuther *et al.* (Bayreuther, K. *et al.*, 1988) ont découvert que les fibroblastes humains progressent spontanément à travers sept étapes, chacune caractérisée par des critères morphologiques et biochimiques précis ("pattern" de protéines séparées en gel à 2 dimensions). Ces étapes portent le nom de morphotypes car elles ont tout d'abord été définies morphologiquement (figure I-4.).

Les trois premiers (MF I, MF II, MF III) sont mitotiques; ils sont abondants dans les cultures de cellules en croissance.

Les quatre autres sont postmitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII) et ils ne se trouvent qu'à faible taux dans les cultures de cellules qui se divisent. En particulier, le 7ème morphotype (PMF VII) est dégénératif.

Les proportions de morphotypes mitotiques et postmitotiques varient en fonction du nombre de doublements de population atteint par les cellules en culture (Toussaint, O., *et al.*, 1991) (figure I-5.). Des variations similaires existent dans les populations des différents morphotypes au cours du vieillissement *in vivo*, dans la peau par exemple.

La notion de morphotype, c'est-à-dire de stades cellulaires présents sous forme de structures bien définies, permet un lien avec la thermodynamique des systèmes ouverts. En effet, cette théorie peut poser que chacun des stades représente un état stationnaire de production d'entropie et possède un niveau de métabolisme caractéristique (figure I-6.).

3.1.3.2. Un biomarqueur des cellules humaines sénescences en culture: l'activité β -galactosidase associée au vieillissement. (Dimri, G.P. *et al.*, 1995)

Cette activité enzymatique mise en évidence pour la première fois, en 1995, par Dimri *et al.* permet actuellement une détection aisée des cellules sénescences au sein de cultures de fibroblastes. Elle est uniquement présente chez les cellules ayant atteint le stade de la sénescence répliative, c'est-à-dire ayant définitivement arrêté de se diviser.

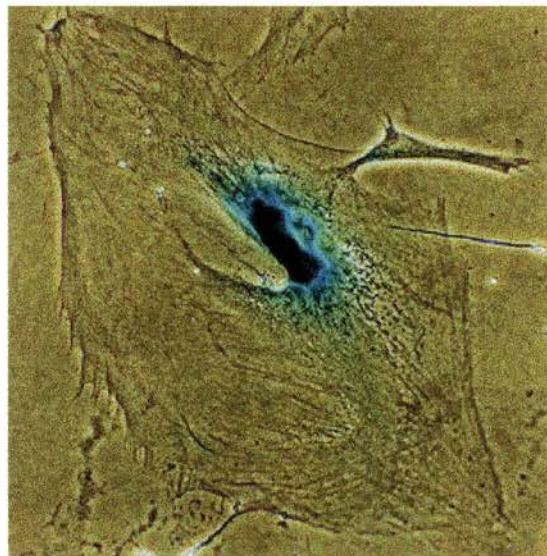
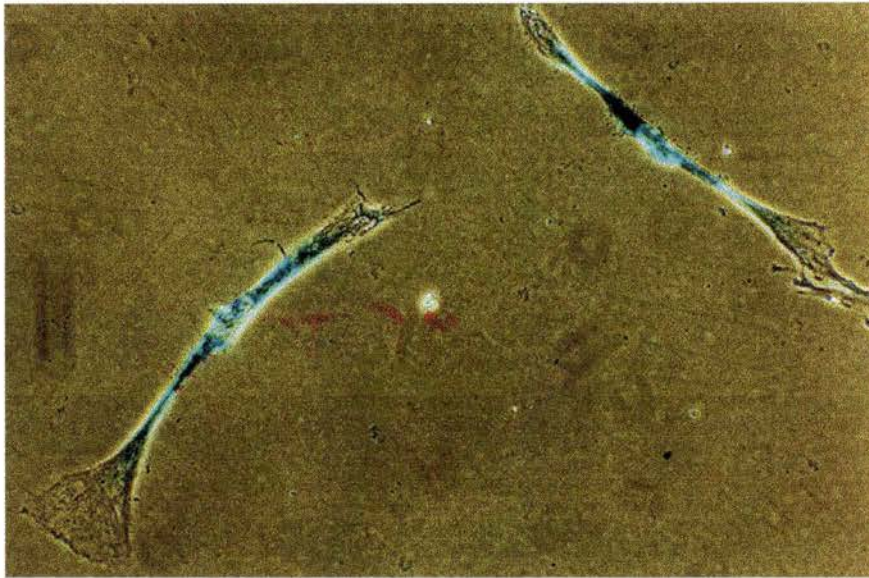


Figure I-7. Photographies de fibroblastes WI-38 colorés pour la mise en évidence de l'activité β -gal associée au vieillissement (grossissement 200 fois).

Pour cette raison, on la nomme «Senescence-Associated β -galactosidase Activity» (SA β -gal). Cette activité semble différente de celle dosée dans la plupart des cellules eucaryotes et dont le pH d'activité optimal est 4. En effet, son optimum d'activité se situe à pH 6.

La SA β -gal a été détectée dans divers types cellulaires comme par exemple les fibroblastes et les kératinocytes (figure I-7.). Elle est toujours absente dans les cellules immortalisées.

Des expériences de marquage simultané à la thymidine tritiée (pour détecter la synthèse d'ADN) et au X-gal (pour détecter une activité β -gal) ont été réalisées sur des cultures de fibroblastes WI-38. Trois types de populations de cellules furent testées: il s'agit de population de cellules caractérisées par un nombre faible, intermédiaire ou élevé de passages en culture. La plupart des cellules des cultures jeunes étaient marquées à la thymidine tritiée et peu l'étaient pour l'activité β -gal à pH 6. La tendance s'inversait cependant lorsque le nombre de passages en culture augmentait.

Un pas en avant est franchi. En effet, la seule mesure du taux de synthèse de l'ADN ne suffisait pas à distinguer les cellules sénescents des cellules quiescentes ou différenciées de façon terminale. Par cellules quiescentes, on entend, des cellules qui ont encore un potentiel prolifératif mais qui ont momentanément arrêté de se diviser soit par privation de sérum ou de facteurs de croissance particuliers soit par inhibition de contact.

D'autre part, une grande proportion de fibroblastes issus de patients atteints du syndrome d'accélération du vieillissement de Werner expriment une activité SA β -gal. Il faut aussi savoir que, dans ce syndrome, on observe une perte très importante du potentiel prolifératif des cellules.

Malgré le fait que son induction lors de la sénescence soit limitée à certains types cellulaires, l'activité SA β -gal apparaît comme un bon marqueur *in vitro* et *in vivo* de la sénescence dans certains types cellulaires humains.

L'origine de cette activité est toujours inconnue. Plusieurs hypothèses ont été émises.

- Soit il s'agit d'une augmentation de l'activité β -gal «classique» des lysosomes qui prend une ampleur telle qu'elle devient également détectable à

pH 6. Cette hypothèse est appuyée par l'observation généralisée d'une élévation du niveau de toutes les activités enzymatiques du lysosome dans les cellules sénescents.

- Soit il s'agit de l'expression d'une forme de l'enzyme épissée de façon différente, et qui aurait une activité optimale à pH 6. Il est aussi envisagé que cette forme de l'enzyme aurait une localisation différente, ce qui décalerait son pH optimum d'activité de 4 à 6.

Parmi les données qui peuvent préférentiellement étayer l'une ou l'autre hypothèse, on notera que la simple surexpression de l'ADN complémentaire de l'enzyme normale lysosomale provoque l'apparition de l'activité SA β -gal à pH 6. Ceci laisse supposer qu'il s'agirait d'un pic de surexpression de la β -gal lysosomale qui participerait, au moins en partie, à l'activité SA β -gal des cellules sénescents.

Pour finir, il est improbable que l'activité SA β -gal soit la cause de l'arrêt de croissance des cellules sénescents puisque la surexpression de la β -galactosidase n'entraîne pas un arrêt des mitoses.

3.2. Effets des stress oxydatifs sublétaux sur le vieillissement cellulaire.

3.2.1. Modèle de stress oxydatif au tert-butylhydroperoxyde

Le tert-butylhydroperoxyde (tBHP) est un hydroperoxyde organique très souvent utilisé dans l'étude de la mort cellulaire par nécrose. Il s'agit d'une molécule amphiphile qui pénètre facilement à travers les membranes biologiques et génère des radicaux hydroxyles par interaction avec des métaux de transition, classiquement le fer, dans une réaction similaire à la réaction de Fenton:



Les radicaux hydroxyles sont capables d'initier la peroxydation lipidique. Il s'ensuit une augmentation de la perméabilité membranaire, mais

également des variations du taux de calcium dans divers compartiments de la cellule, certaines altérations chromosomiques, ainsi qu'une inhibition de la synthèse de l'ADN et de la mitose.

3.2.2. Effet des stress sur les biomarqueurs du vieillissement *in vitro*.

Comme décrit plus haut, les morphotypes sont un excellent biomarqueur du vieillissement des fibroblastes en culture.

Des expériences de stress unique au tBHP ont montré un effet d'accélération du vieillissement, illustré par la diminution de la proportion de morphotypes dits jeunes (I et II) au profit d'une augmentation des morphotypes dits âgés (de III à VI) dans la population de départ. Aucun morphotype VII n'est observé car ceux-ci sont dégénératifs et donc disparaissent rapidement.

On a également démontré, au moyen d'un stress par jour pendant 1 à 5 jours, que la progression de la population vers les morphotypes âgés dépend directement du nombre de stress effectués.

En ce qui concerne l'activité β -gal associée au vieillissement, une augmentation de la proportion de cellules présentant cette activité a été observée, après des stress successifs au tBHP. La tendance est donc confirmée pour ce biomarqueur.

Il est en effet à noter que dans une population de cellules, lors du vieillissement normal comme lors du vieillissement accéléré par les stress, il existe une relation directe entre l'abondance d'un morphotype donné, donc le degré d'avancement du vieillissement des fibroblastes, et la proportion de fibroblastes présentant cette activité.

3.2.3. Les stimulations aux cytokines comme l'IL-1 et le TNF- α jouent un rôle dans la progression d'une population de cellules vers des morphotypes âgés.

L'IL-1 et le TNF sont des cytokines pro-inflammatoires produites par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T en réponse à des stimuli comme des produits microbiens, des virus, des immuns complexes, des

cellules T activées... Les actions inflammatoires qu'elles entraînent sont telles que l'induction de molécules d'adhésion comme par exemple la E-sélectine et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) (Dinarello, C.A., 1994).

Il existe deux formes de chaque cytokine mais, alors que les IL-1 α et β et le TNF- α sont synthétisés par les monocytes et les macrophages activés, le TNF- β est uniquement synthétisé par les lymphocytes T activés.

C'est par leur mode de transduction du signal que ces cytokines peuvent provoquer une libération de radicaux libres menant à un vieillissement accéléré (Meier, B. *et al.*, 1991).

En effet, le métabolisme oxydatif mitochondrial et la production de radicaux libres due à son fonctionnement sont impliqués non seulement dans les dommages cellulaires mais aussi dans l'activation de certaines kinases (comme les MAPK, mitogen activated protein kinases) ou certains facteurs de transcription (comme NF- κ B). Ceci est appuyé par le fait que les anti-oxydants, tels que la N-acétyl-L-cystéine, peuvent inhiber l'activation de NF- κ B causée par l'IL-1 α ou le TNF- α , ou bien par de faibles stress à l'H₂O₂ (Renard, P. *et al.*, 1997).

Malgré une voie de transduction du signal causant la libération de radicaux libres, le TNF n'est pas cytotoxique pour la plupart des types cellulaires de mammifères comme les fibroblastes.

4. Rôle du métabolisme énergétique dans la résistance aux stress (Toussaint, O. et Remacle, J., 1994).

Comme décrit plus haut dans la théorie thermodynamique, la cellule peut être considérée comme un système qui optimise sa production d'énergie pour maintenir sa structure et ses fonctions, et ce malgré les stress qu'elle subit.

En ce sens, de nombreuses expériences ont permis d'aboutir à la conclusion que certains composés relatifs au métabolisme énergétique tels que le D-glucose, le pyruvate et le glutamate plus malate ont un effet protecteur face aux stress. Le L-glucose, qui ne peut en aucun cas être assimilé par la cellule, n'a quant à lui aucun effet protecteur.

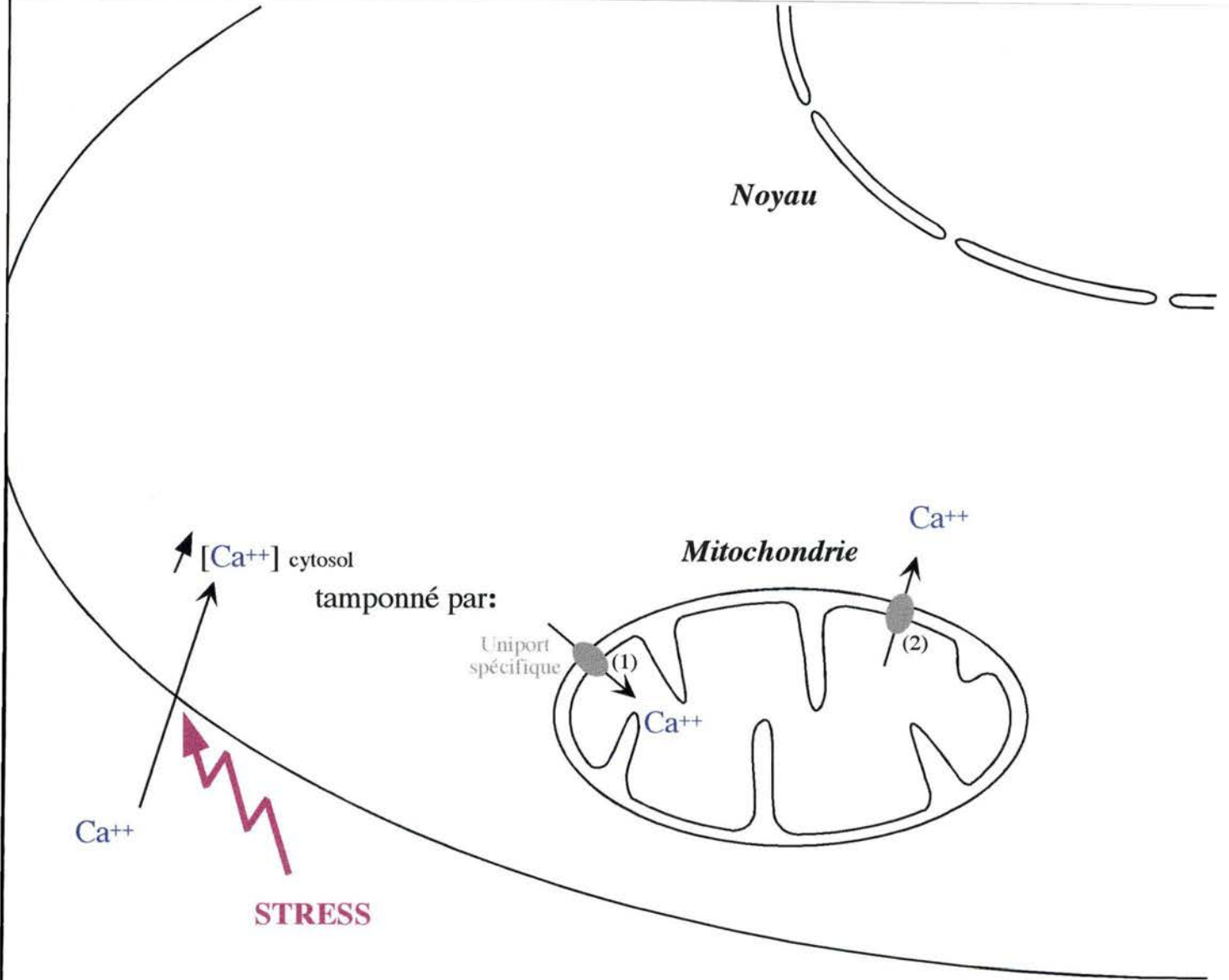


Figure I-8. Représentation schématique du cycle du calcium induit par un stress à l'intérieur de la cellule. L'entrée de Ca^{++} est causée par le stress, ce qui provoque l'augmentation de la concentration en Ca^{++} cytosolique. Celle-ci est tamponnée par une prise de Ca^{++} via un uniport spécifique (1) au niveau de la membrane mitochondriale. Le calcium suit un cycle dans la mitochondrie et est finalement relargué (2) par une voie distincte de son entrée.

Plus particulièrement, une cytotoxicité accrue du tBHP sous hypoxie a été démontrée, bien que le taux de peroxydation lipidique fût plus bas dans ces conditions. La mort cellulaire résulte donc dans ce cas d'une diminution de la capacité de défense des cellules, liée à une moindre capacité de production d'énergie suite à une faible disponibilité en oxygène, et non à la présence de lipides peroxydés.

5. Etude du métabolisme du calcium lors des stress.

Le Ca^{++} est un messager secondaire commun qui régule une variété de processus biologiques, comme la transcription de certains gènes ou la croissance cellulaire. Le Ca^{++} provient soit de l'espace extracellulaire, soit de réserves intracellulaires telles que celle contenue dans le réticulum endoplasmique.

En outre, il a été démontré que les oxydants stimulent le métabolisme du calcium en augmentant la concentration cytosolique en Ca^{++} (figure I-8.). Dans ces circonstances précises, la source de Ca^{++} est controversée et les cibles ne sont pas toutes définies. Plusieurs observations sont faites, dans beaucoup de types cellulaires différents:

- des applications de tBHP à une concentration de 200 μM provoquent une amplification des oscillations du taux de Ca^{++} dans les hépatocytes sans que la formation d'inositol triphosphate stimulé ne soit requise. Un effet semblable est observé dans les macrophages

- on constate de façon invariable une relation temporelle dans ce système entre l'oxydation des pyridine nucléotides et l'élévation du taux de Ca^{++} intracellulaire, c'est-à-dire le mécanisme de signal par le Ca^{++} médié par le tBHP.

5.1. Le métabolisme calcique mitochondrial.

Un phénomène plus précis est induit au niveau des mitochondries. Se basant sur le postulat précédent, la première découverte fut que le tBHP induisait un relargage du Ca^{++} accumulé, dans un processus électroneutre

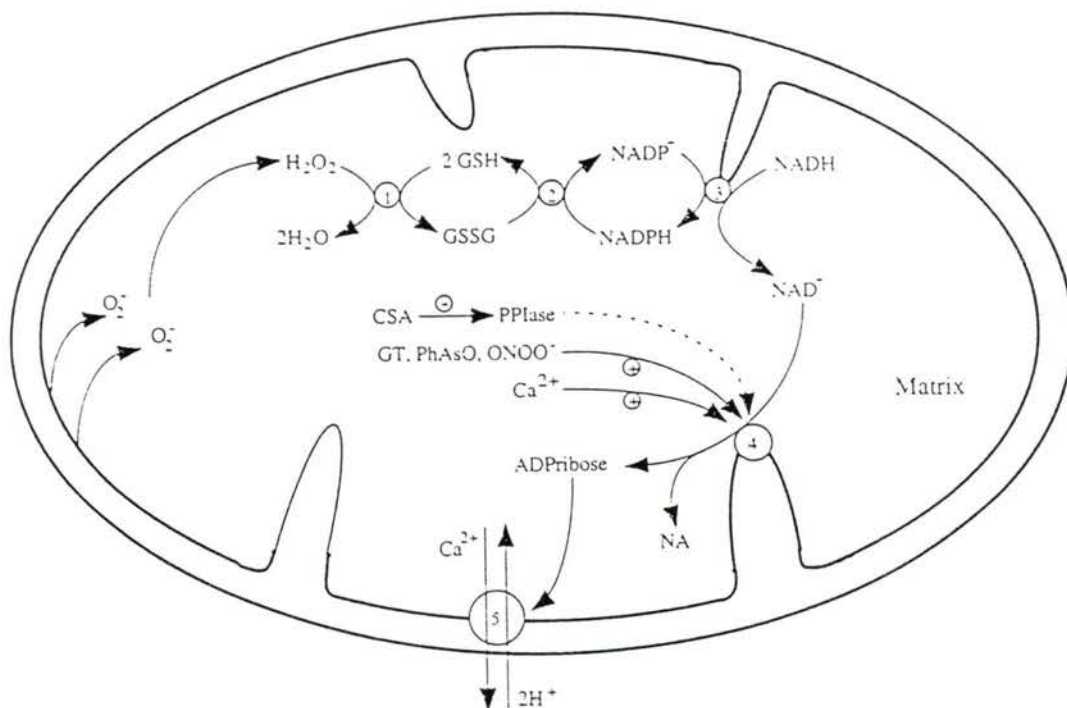


Figure I-9. Régulation du relargage spécifique de Ca^{2+} par la mitochondrie. La cascade enzymatique est composée de la glutathion peroxydase (1), la glutathion réductase (2), la transhydrogénase intervenant dans la chaîne énergétique (3), la NAD^+ glycohydrolase (4) et aboutit probablement à une protéine réalisant un antiport $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$. La peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) ou cyclophiline, agit sur la glycohydrolase responsable de l'hydrolyse du NAD^+ et peut être inhibée par la cyclosporine A (CSA) (d'après Richter et Schweizer, 1997).

dépendant de l'oxydation de NAD(P)H et ensuite de l'hydrolyse de NADP⁺ (Suzuki, Y.J. *et al.*, 1997)

Or, on sait également que face à cette entrée massive de Ca⁺⁺ dans le cytosol, les mitochondries ont un rôle de tampon: un cycle de Ca⁺⁺ s'installe au travers de la membrane interne car la prise et le relargage de Ca⁺⁺ mitochondrial se font par deux voies différentes.

Pour Richter et Schweizer (Richter, C. et Schweizer, M., 1997), le relargage impliquerait un processus d'échange spécifique entre Ca⁺⁺ et H⁺, lié à l'état oxydatif des pyridine nucléotides de la mitochondrie. On observe en effet que les hydroperoxydes comme le tBHP favorisent l'oxydation de ces nucléotides, phénomène passant par une cascade enzymatique précise. Celle-ci comprend séquentiellement la glutathion peroxydase, qui favorise l'oxydation de glutathion à partir du peroxyde d'hydrogène engendré par la libération de formes réactives d'oxygène moléculaire, et par la glutathion réductase, qui réduit le glutathion pour oxyder un pyridine nucléotide. Sous cette forme, ce dernier est capable de transférer son pouvoir oxydatif à un autre pyridine nucléotide (le plus souvent NADH). Cette oxydation est suivie de l'hydrolyse du NAD(P)⁺ par la NAD⁺ glycohydrolase en ADP-ribose et nicotinamide. Ce dernier composé se lierait alors à une protéine spécifique de la membrane mitochondriale interne menant finalement au relargage de calcium chez des mitochondries intactes, vraisemblablement via un antiport Ca⁺⁺/2H⁺.

Il s'agit donc d'un efflux de Ca⁺⁺ dépendant du NAD(P)⁺ mais indépendant d'une perte du potentiel de membrane mitochondriale et qui peut être inhibé par la cyclosporine A (CSA) dans certains types cellulaires. Cependant le rôle exact du Ca⁺⁺ dans la mort cellulaire n'est pas clair. Un cycle excessif de Ca⁺⁺ au travers de la membrane mitochondriale interne pourrait s'engager suite à la stimulation par les prooxydants, menant finalement à la perte du potentiel de membrane. La membrane mitochondriale interne deviendrait plus lâche, il y aurait inhibition de la synthèse d'ATP, et globalement un dommage aux mitochondries. Dans l'hypothèse de Richter, l'effet de la cyclosporine A serait d'inhiber une enzyme, la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase ou cyclophiline, agissant sur la glycohydrolase responsable de l'hydrolyse du NAD⁺, nécessaire dans le phénomène de relargage de Ca⁺⁺ (figure I-9.).

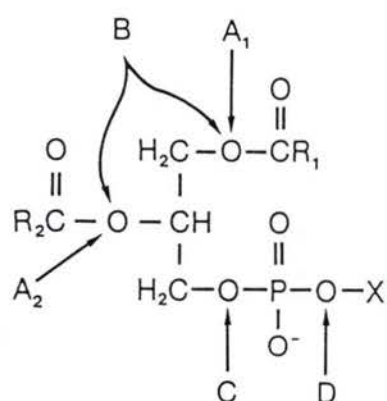


Figure I-10. Sites d'hydrolyse des phospholipides par les différentes phospholipases (A1, A2, B, C et D) (d'après Waite, 1996).

Pour l'équipe de Bernardi (Petronilli, V. *et al.*, 1994), une autre hypothèse est envisagée. Après accumulation du Ca^{++} dans la matrice mitochondriale, des pores formés suite à des dommages occasionnés à la membrane mitochondriale interne entraînent une perte de perméabilité qui est transitoire. Ces pores très conductifs semblent modulés par le potentiel de membrane et également par des sites régulateurs, dont l'un situé du côté de la matrice, dépendant d'ions divalents. Le Ca^{++} qui s'y lie augmente la probabilité qu'il s'ouvre. Il s'ensuit une diminution de la synthèse d'ATP et du flux d'électrons dans la membrane ainsi qu'une perméabilité accrue des mitochondries aux solutés et aux ions qui provoque un découplage. L'action de la cyclosporine A serait d'inhiber ce pore, probablement par l'intermédiaire de la formation d'un complexe CSA-cyclophiline, bien qu'aucune évidence directe n'ait été trouvée.

C'est au niveau de l'étude des cibles de la cyclosporine A que peut se situer le trait d'union entre ces deux hypothèses (pour une revue, voir Fairley, J.A., 1990). En effet, la cyclophiline est une des cibles intracellulaires privilégiées de la cyclosporine A, à laquelle elle se lie avec une haute affinité. Par séquençage d'acides aminés, il a été mis à jour que la cyclophiline est identique à l'enzyme peptidyl-prolyl cis-trans isomérase. La PPIase catalyse l'isomérisation des prolines et donc le repliement des protéines. En présence de CSA, ce repliement des protéines est inhibé car la PPIase est inhibée.

Cette information semble appuyer l'hypothèse de Richter: la PPIase inhibée serait incapable d'activer le repliement de la NAD^+ glycohydrolase et donc cette dernière resterait inactive.

5.2. L'activation et le rôle de la phospholipase A_2 en rapport avec le métabolisme calcique.

5.2.1. La PLA_2 : généralités (Waite, 1996).

La phospholipase A_2 (PLA_2) fait partie d'un groupe d'enzymes ubiquistes, les phospholipases, qui ont toutes la propriété d'hydrolyser les phospholipides. Elles se différencient toutefois par le site sur lequel elles attaquent le phospholipide (figure I-10.), ce qui constitue en outre le critère de classement de cette famille d'enzymes.

La PLA₂, qui nous intéresse plus particulièrement, hydrolyse les phospholipides en position 2 acyl-ester, libérant de cette façon l'acide gras en position 2. Une libération préférentielle de l'acide arachidonique résulte de la localisation spécifique de cet acide en position 2-acyl.

Il existe différents types de PLA₂, essentiellement distinguées par leur taille et leur localisation dans le compartiment cellulaire:

- groupes I à III: enzymes de faible poids moléculaire (14 kDa), sécrétées hors de la cellule et qui peuvent soit rester liées à un site externe soit se trouver sous forme soluble dans les liquide extracellulaires. Elles sont divisées en trois groupes selon des différences au point de vue évolutif, mises en évidence par leur séquence. On retrouve par exemple des PLA₂ présentes dans les venins de serpent ou des formes pancréatiques.

- groupe IV: formes cytosoliques de l'enzyme, caractérisées par un poids moléculaire élevé (85 kDa).

Ce sont ces dernières formes qui nous intéressent en particulier.

Une caractéristique est cependant largement étendue au sein de cette famille de phospholipases: leur activation est dépendante du calcium. Il est toutefois à noter qu'il existe un groupe de PLA₂ dont le mécanisme d'activation semble indépendant de la présence de calcium.

5.2.2. L'activation de la forme cytosolique de la PLA₂ par le calcium. (pour une revue, voir Mayer, R.J. et Marshall, L.A., 1993; Waite, 1996)

Quelle que soit la forme de l'enzyme, la disponibilité en calcium semble être une condition requise pour l'activation de la PLA₂.

En particulier, bien qu'ayant toujours été isolée à partir de la fraction cytosolique de la cellule, cette isoforme enzymatique est transloquée en membrane lors de son activation. Elle possède en outre une région de liaison au phospholipide dépendante du calcium commune à beaucoup de protéines qui sont transloquées en membrane en présence de Ca⁺⁺.

Des expériences ont montré qu'une augmentation du taux de Ca⁺⁺ cytosolique provoque une suractivation de la PLA₂. Celle-ci est plutôt due à une favorisation de l'association de l'enzyme avec le phospholipide membranaire qu'à une implication dans la catalyse proprement dite.

5.2.3. Les effets de la PLA₂. (pour une revue, voir Chang, J. et al., 1987)

Une fois activée, la PLA₂ peut médier toute une série d'effets directs ou via une transformation de ses produits. L'acide arachidonique, produit de dégradation des phospholipides membranaires par cette enzyme, peut en effet être ensuite transformé en diverses substances biologiquement actives comme les prostaglandines, leucotriènes ou le platelet-activating factor. Elles sont impliquées dans les phénomènes d'inflammation et de dommages aux tissus.

L'activation de la PLA₂ peut également intervenir dans la modification de la fluidité des membranes. Un rôle de cette enzyme a effectivement été constaté dans le cycle de dégradation des lipides membranaires par déacylation/réacylation, effet encore augmenté en cas de peroxydation lipidique au sein de ces mêmes membranes.

5.2.4. Les inhibiteurs de la PLA₂. (pour une revue, voir Chang, J., et al., 1987)

Il existe divers types d'inhibiteurs de PLA₂, qui sont classiquement groupés en fonction de leur mode d'action sur l'enzyme.

Tout d'abord, la propriété d'interférer avec l'interface substrat-enzyme est une caractéristique partagée par un premier groupe d'inhibiteurs. On retrouve dans cette catégorie des composés qui rendent la membrane plus fluide ou bien plus rigide. Ceci souligne l'importance critique de l'architecture du substrat.

Une deuxième catégorie est celle des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens, surtout caractérisés par leur effet thérapeutique.

On trouve aussi des agents se liant de façon covalente à l'enzyme ou bien des analogues de substrat.

Enfin, la forme d'inhibiteur qui nous intéresse principalement dans le cadre de ce travail est celle des agents modulant le niveau de calcium intracellulaire. En particulier, la trifluoperazine, antagoniste de la calmoduline, est capable d'aller à l'encontre de la libération d'acide arachidonique. Cette observation suggère un rôle de la calmoduline dans l'activation de la PLA₂, vraisemblablement par la formation d'un complexe calcique susceptible d'interagir avec l'enzyme Ca⁺⁺-dépendante et de l'activer.

II. OBJECTIFS

Dans ce travail, nous allons premièrement tester si des stimulations cellulaires successives à l'aide de cytokines comme l'IL-1 α et le TNF- α peuvent avoir un effet sur l'apparition de biomarqueurs du vieillissement *in vitro* puisque des productions radicalaires ont été mises en évidence lors de la transduction du signal généré par ces cytokines. Deux biomarqueurs seront testés: la transition vers des morphotypes plus âgés et l'apparition de cellules présentant une activité β -galactosidase liée à la sénescence.

Ensuite, nous mettrons au point des conditions de stress successifs et sublétaux sous tert-butylhydroperoxyde permettant d'obtenir à la fois un état de sénescence plus avancé et une détection de l'activité β -galactosidase liée à la sénescence en spectrophotométrie.

Ayant mis ces conditions au point, nous nous attacherons à tester l'hypothèse d'un rôle éventuel du métabolisme calcique dans la survie des cellules aux stress sous tBHP et dans leur passage, lors de stress plus faibles mais répétés, à un état de sénescence plus avancé.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

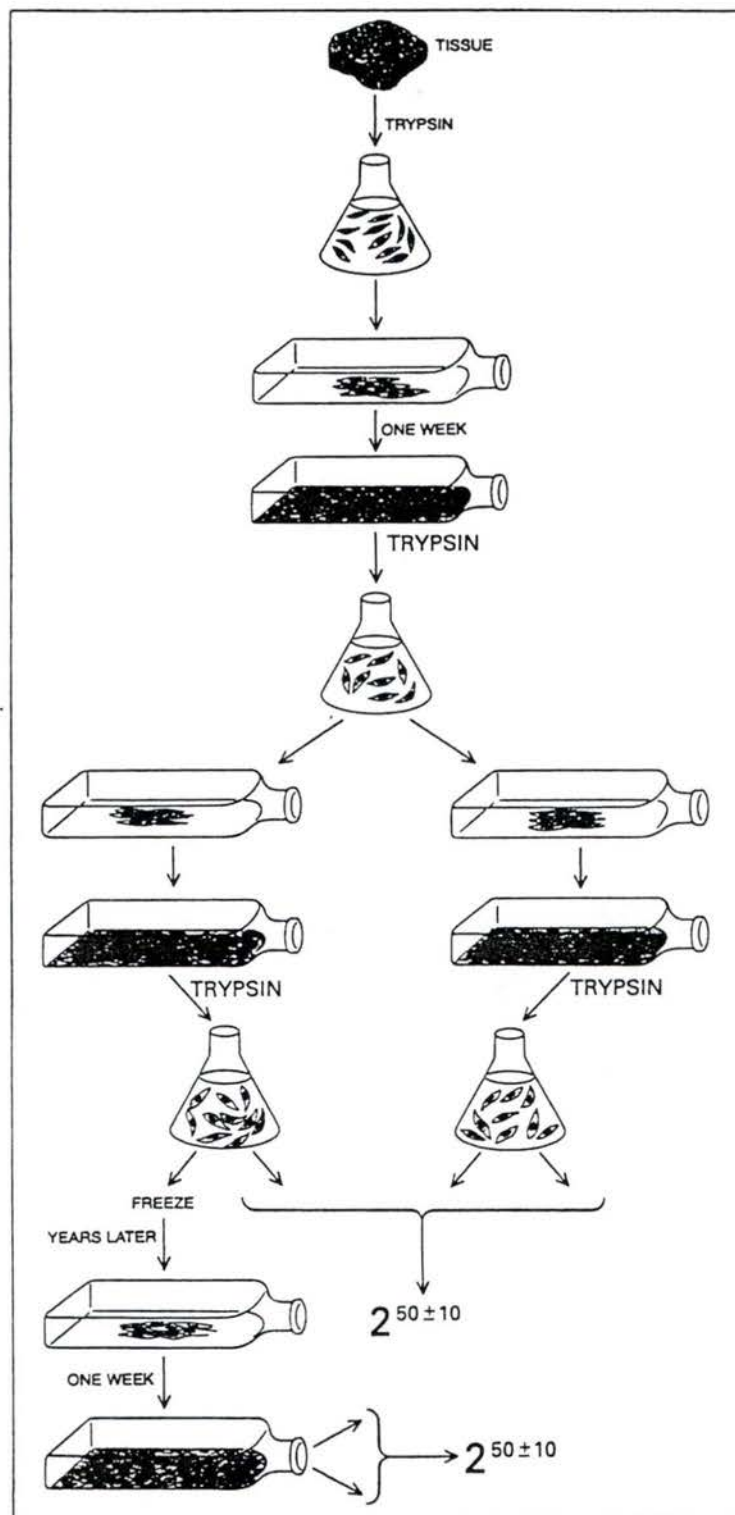


Figure II-1. Représentation schématique du principe de culture cellulaire.

1. Culture de fibroblastes. (figure II-1.)

Les fibroblastes WI-38 utilisés dans le cadre de ce travail sont des cellules embryonnaires de poumon humain (American Type Culture Collection, U.S.A.).

Ces cellules ont été mises en culture selon la procédure classique décrite par Hayflick (Hayflick, L., 1965).

1.1. Matériels.

- BME: Milieu basal de Eagle contenant des sels de Earle, 13 acides aminés essentiels, 8 vitamines (Gibco, Grande-Bretagne).
- BME + SB 10%: Milieu BME additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).
- Trypsine: Solution stérile de trypsine à 0,25% dans un tampon composé de 0,4 g/l de KCl; 2,2 g/l de NaHCO_3 ; 6,8 g/l de NaCl; 1 g/l de glucose et 0,0005 g/l de rouge de phénol (Gibco, Grande-Bretagne).
- BME + DMSO 10%: Dimethylsulfoxyde (Acros Chimica, Belgique) dilué à une concentration de 10% dans du BME. Le DMSO est utilisé comme cryoprotecteur lors de la congélation des cellules.
- Milieu de rinçage: BME.
- Plaque multi-puits: Stériles et de 24 cupules de 2 cm² (Corning, U.S.A.).
- Boîtes de culture: Stériles et de 75 cm² (Corning, U.S.A.).

Les solutions de trypsine et le sérum de veau foetal sont conservés à -20°C et les autres milieux à 4°C. Tous sont réchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

1.2. Méthodes

1.2.1. Repiquage de cellules.

Les cellules sont cultivées selon la méthode décrite par Hayflick (Hayflick, L., 1965) dans des boîtes de culture de 75 cm². Lorsqu'elles arrivent à confluence, ce qui représente une densité moyenne de 4.10⁴ cellules par cm², les cellules sont repiquées dans des conditions stériles. Pour ce faire, elles sont rincées dans 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum, celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases. Ensuite, les cellules sont incubées à température ambiante avec 2 ml de trypsine jusqu'à ce que l'on observe l'arrondissement et le début du détachement cellulaire au microscope à contraste de phase, c'est-à-dire pendant environ deux minutes. La trypsine est alors décantée, la boîte est placée dans une étuve à 37°C pendant une dizaine de minutes afin d'accélérer le processus de détachement cellulaire. On ajoute ensuite 10 ml de BME + SB 10%, le sérum inactivant la trypsine. A l'aide d'une pipette pasteur, on rompt les agrégats cellulaires. Les cellules sont ainsi resuspendues dans les 10 ml de BME + SB 10%. A ce stade, un comptage peut être réalisé en prélevant 2 gouttes de la suspension cellulaire et en les déposant dans une chambre de Neubauer (Vel, Belgique).

Pour terminer, on répartit cette suspension cellulaire dans 2 (ou 4) boîtes de 75cm² et on porte le volume de chacune d'elles à 15 ml de BME + SB 10%. La suspension cellulaire peut être également transférée dans des boîtes de culture de 25 cm², ou dans des boîtes multi-puits (à une densité estimée par comptage cellulaire à l'aide de la chambre de Neubauer) selon le type d'expérience que l'on souhaite réaliser.

On ajuste le pH du milieu des boîtes de cultures en ajoutant un mélange gazeux contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Quant aux boîtes multi-puits, elles sont placées dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂, jusqu'au lendemain (jour d'utilisation des cellules).

1.2.2. Congélation des cellules.

Les cellules sont rincées et trypsinisées suivant la méthode décrite ci-dessus. Après centrifugation pendant 10 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal,

Allemagne), on resuspend le culot ainsi obtenu dans 0,4 ml de BME + SB 40%. On place ensuite ce milieu contenant les cellules dans une ampoule stérile (Nunc, Danemark). Juste avant la congélation, on ajoute 0,4 ml de BME + DMSO 10%.

La congélation est réalisée au moyen d'un appareil programmable (L'Air Liquide, Belgique) pour diminuer la température de 1°C par minute.

L'ampoule contenant les cellules est alors stockée dans l'azote liquide à -196°C.

La congélation peut également être réalisée en plaçant l'ampoule dans un tube de 50 ml vide et hermétiquement fermé que l'on plonge dans un récipient contenant de l'alcool-éther, ce qui ralentit la congélation des cellules lorsqu'on les met à -70°C. Après congélation, l'ampoule peut ensuite être transférée à -196°C dans l'azote liquide.

1.2.3. Décongélation des cellules.

L'ampoule de cellules stockée dans l'azote liquide est immédiatement plongée dans un bain à 40°C. Après décongélation (étape rapide devant se dérouler en moins d'une minute), les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal, Allemagne). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans du BME + SB 10% avant d'être transféré dans une boîte de culture.

Le lendemain, il est nécessaire de changer le milieu afin d'éliminer toute trace de DMSO, toxique pour les cellules.

2. Test de cytotoxicité.

2.1. Etude de l'effet cytotoxique de stress cellulaires.

2.1.1 Matériels.

- BME: (Gibco, Grande-Bretagne).
- tert-butylhydroperoxyde (Merck, Allemagne).
- Plaques multi-puits: stériles et de 24 cupules de 2 cm² (Corning, U.S.A.).

- BME + SB 10%: Milieu BME additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).

2.1.2 Méthodes.

Les cellules sont repiquées dans des plaques multi-puits de 24 cupules en présence de BME + SB 10%. Lorsque les cellules atteignent la subconfluence d'environ 80000 cellules/2 cm², elles sont soumises à différentes concentrations en tBHP diluées dans du BME (5.10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 5.10⁻⁴ M) durant une heure, pendant laquelle elles sont placées à l'étuve à 37°C contenant 5% de CO₂. Après le stress, les cellules sont rincées une fois au BME (1 ml par puits) et ensuite 1 ml de BME +SB 10% est remplacé dans chaque puits.

2.2. Etude du rôle du métabolisme du calcium dans la cytotoxicité des stress au tBHP.

2.2.1. Matériels.

- BME: (Gibco, Grande-Bretagne).
- HBSS: « Hank's Balanced Salt Solution », tampon composé de (pour 500 ml):
 - 4 g de NaCl (Merck, Allemagne)
 - 0,5 g de L-glucose (Sigma, U.S.A.),
 - 0,2 g de KCl (Merck, Allemagne),
 - 0,05 g de Mg SO₄ . 7 H₂O (Merck, Allemagne),
 - 0,05 g de MgCl₂ . 6 H₂O (Merck, Allemagne),
 - 0,38 g de Na₂ H PO₄ . 2 H₂O (Merck, Allemagne) et
 - 0,03 g de KH₂PO₄ (Merck, Allemagne).

Au dernier moment on ajoute 0,5ml de CaCl₂ 0,1 M/100 ml d'HBSS pour arriver à une concentration finale en CaCl₂ de 1 mM.

Placer à 37°C.

Mettre à pH 7,35.

- tBHP: (Merck, Allemagne).
- EGTA: Acide éthylène glycol - bis (b-Aminoéthyl éther) N, N, N', N' -tétraacétique (Sigma, U.S.A.).

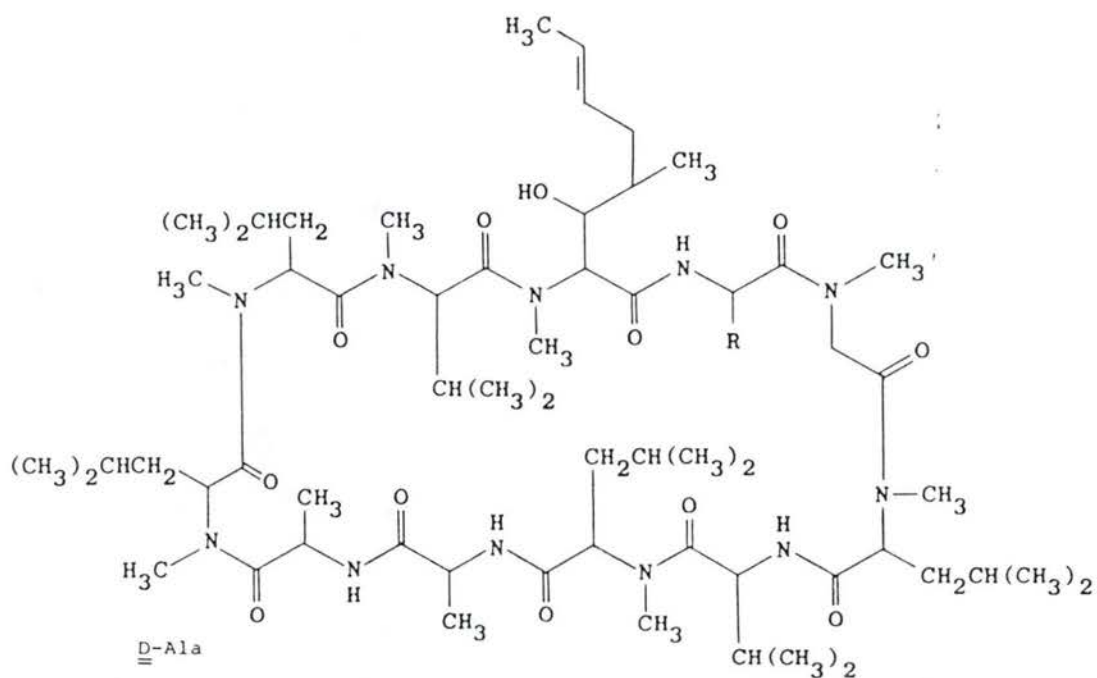


Figure II-2. Structure de la cyclosporine A. Il s'agit d'un oligopeptide cyclique, produit par *Tolypocladium inflatum* Gams. La cyclosporine A est le composant majeur du groupe des cyclosporines.

- BAPTA-AM: Acide 1,2 bis (2-Aminophénoxy) éthane-
N, N, N', N' -tétraacétique tétrakis
(Acétoxyméthyl ester) (Sigma, U.S.A.).
- Digitonine: (Merck, Allemagne).
- Ruthenium Red: (Sigma, U.S.A.).
- Thapsigargine: (Sigma, U.S.A.).
- Cyclosporine A (figure II-2.): (fournie par le Professeur Richter,
Zürich).
- D-glucose: (Merck, Allemagne).
- Trifluoperazine: (Sigma, U.S.A.).

2.2.2. Méthodes.

Les fibroblastes sont repiqués dans des boîtes multi-puits à la densité de 80000 cellules/2 cm². Le lendemain, ils sont soumis à des stress au tBHP pendant 1 heure; dont différentes concentrations sont diluées dans différents milieux:

concentration	composition du milieu
tBHP 5.10 ⁻⁵ M, 10 ⁻⁴ M, 5.10 ⁻⁴ M	- BME + EGTA 2 mM
	- HBSS avec ou sans CaCl ₂
	- BME + BAPTA-AM 75 µM
	- BME + Ruthenium Red 10 µM + Digitonine 1 µM
	- BME + thapsigargine 5 µM
	- BME + cyclosporine A 5 µM
	- PBS + cyclosporine A 5 µM + D- glucose 5 mM
	- BME + trifluoperazine 10 µM

2.3. Mesure de la toxicité par dosage de protéines.

2.3.1. Matériels.

- PBS: « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate 10 mM contenant 0,9% de NaCl et à pH 7,4.
- solution d'étalon protéine (albumine de sérum bovin) à 200 µg/ml (Sigma, U.S.A.).
- NaOH 0,5 N et 1 N (Merck, Allemagne).
- Mixture alcaline à préparer juste avant l'emploi:
 - 100 ml Na_2CO_3 2% (Merck, Allemagne).
 - 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1% (Merck, Allemagne).
 - 1 ml $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ 2% (Merck, Allemagne).
- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu à diluer 2 fois avant utilisation (Sigma, U.S.A.).

2.3.2 Méthodes.

Un jour après le stress, les protéines cellulaires sont dosées par la méthode de Lowry (Lowry, O.H. *et al.*, 1951). Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron Instruments, Italie) et est proportionnelle à la quantité de protéines présente.

Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 0,4 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes minimum.

Parallèlement, on prépare le blanc et l'étalon:

- blanc: 0,2 ml d'eau + 0,2 ml de NaOH 1 N
- étalon: 0,2 ml d'étalon albumine + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes.

Les protéines cellulaires sont resuspendues et les fractions de 0,4 ml sont récoltées. Le blanc et l'étalon sont gardés tels quels.

Ces fraction peuvent soit être dosées directement, soit conservées à 4°C jusqu'au lendemain.

A chaque tube on ajoute 2 ml de mixture alcaline de 30 secondes en 30 secondes. Celle-ci doit agir seule pendant 5 à 15 minutes. Ensuite, 0,2 ml de réactif de Folin sont ajoutés en respectant le temps et l'ordre des tubes, qui sont immédiatement et vigoureusement agités. La densité optique (D.O.) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes.

La concentration en protéines se calcule comme suit:

(DO échantillons - DO blanc)

Concentration en µg/ml = 200 *----- * dilution

(DO étalon -DO blanc)

3. Les stress et stimulations cellulaires et leurs conséquences sur les biomarqueurs du vieillissement.

3.1. Stress successifs.

3.1.1. Matériels.

- | | |
|----------------------------|--|
| - BME: | (Gibco, Grande-Bretagne). |
| - tert-butylhydroperoxyde: | (Merck, Allemagne). |
| - Plaques multi-puits: | Stériles, 24 cupules de 2 cm ² (Corning, U.S.A.). |
| - BME + SB 10%: | Milieu additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche). |

3.1.2. Méthodes.

Les cellules sont repiquées dans des plaques multi-puits à 80000 cellules/puits; des triplicats sont réalisés.

A partir du lendemain, elles sont soumises à 5 stress successifs d'une heure sous tBHP 30 μ M, avec un laps de temps de 24 heures entre les stress. Après chaque stress, les puits contenant les cellules sont rincés au BME puis on replace du milieu de culture frais additionné de 10% de sérum.

3.2. Effets de la composition du milieu de stress.

3.2.1. Matériels.

- BME: (Gibco, Grande-Bretagne).
- tBHP: (Merck, Allemagne).
- BAPTA-AM: (Sigma, U.S.A.).
- BME + SB 10%: Milieu additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).

3.2.2. Méthodes.

Il s'agit de réaliser 5 stress successifs à 24 heures d'intervalle, et sous une concentration de 30 μ M de tBHP dilué dans du BME pendant une heure pour chaque stress. On ajoute toutefois au milieu de stress du BAPTA-AM à 75 μ M pour la moitié des puits.

Après chaque stress, les cellules sont rincées au moyen de BME puis remplacées dans du BME + SB 10%.

3.3. Mesure de l'effet des stress successifs et de la composition du milieu sur le vieillissement accéléré en se référant au biomarqueur SA β -gal.

3.3.1. Matériels.

- Boîtes de Pétri: Stériles et de 35 mm de diamètre (Falcon, U.S.A.).
- PBS: Tampon phosphate 10 mM contenant 0,9% de NaCl, pH 7,4.
- Méthanol: (Sds, France).

- Solution de fixation: 2% de formaldéhyde (Belgolabo, Belgique) et 0,2% de glutaraldéhyde (Fluka, Suisse) dilués dans du PBS.
- Solution de coloration: - 4 ml de solution d'acide citrique dans un tampon phosphate.

Pratiquement, on mélange 36,85 ml de monohydrate d'acide citrique 0,1 M (Merck, Allemagne) avec 63,15 ml de solution de phosphate de sodium 0,2 M.

- 1 ml de ferrocyanide de potassium 100 mM (UCB, Belgique).
- 1 ml de ferrocyanure de potassium 100 mM (UCB, Belgique).
- 0,6 ml de NaCl 5M (Merck, Allemagne).
- 40 µl de MgCl₂ 1M (Merck, Allemagne).
- 13,4 ml d'eau distillée.
- 1 ml d'une solution à 20 mg/ml de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) (Sigma, U.S.A.) dilué dans du diméthylformamide (Janssen, Belgique).

Le pH de la solution doit impérativement être de 6,0.

3.3.2. Méthodes.

La coloration va mettre en évidence en bleu principalement le pourtour du noyau, uniquement chez les cellules exprimant la SA β-gal.

Le repiquage des témoins de début de stress se fait au même moment que celui des cellules qui vont subir des stress. Alors que les cellules destinées à être stressées sont repiquées dans des boîtes multi-puits, les témoins de début sont directement repiquées dans des boîtes de Pétri. Celles-ci sont préalablement quadrillées et les cellules y sont repiquées à une très faible densité de 700 cellules/cm².

Ces cellules témoins ne subiront aucun stress et sont fixées et colorées le lendemain du repiquage.

Pour les cellules stressées, le lendemain du dernier stress elles sont repiquées dans des boîtes de Pétri de la même façon. Le jour suivant, elles sont fixées et colorées également, comme décrit ci-dessous:

- chaque boîte est rincée 2 fois au moyen de 2 ml de PBS
- elles sont fixées avec 2 ml de solution de fixation pendant 5 minutes
- elles sont ensuite rincées 2 fois au PBS
- puis colorées en plaçant 2 ml de solution de coloration. On incube les boîtes entre 12 et 16 heures à l'étuve à 37°C sans CO₂ car c'est après ce laps de temps que la coloration est la plus apparente.
- on rince les boîtes avec 2 fois 2 ml de PBS puis 2 fois 2ml de méthanol
- elles sont finalement séchées à l'air libre.

Le comptage des cellules bleues et non bleues se fait au moyen d'un microscope à contraste de phase.

3.4. Le vieillissement accéléré et le biomarqueur SA β -gal détecté par une coloration en puits lisible au spectrophotomètre.

3.4.1. Matériels.

- PBS: Tampon phosphate 10 mM contenant 0,9% de NaCl, pH7,4.
- Solution de fixation: 2% de formaldéhyde (Belgolabo, Belgique) et 0,2% de glutaraldéhyde (Fluka, Suisse) dilués dans du PBS.
- Solution de coloration: - tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0
- on y ajoute une solution ml de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal) (Sigma, U.S.A.) dilué dans du diméthylformamide (Janssen, Belgique), pour arriver à une concentration finale de 1 mg X-gal/ml de tampon phosphate.

3.4.2. Méthodes.

Le lendemain du stress, on colore les cellules directement dans les puits des plaques où elles ont été stressées, de la façon suivante:

- chaque puits est rincé avec 2 fois 1 ml de PBS
- on fixe les cellules en plaçant 1 ml de solution de fixation pendant 5 minutes
- on rince 2 fois avec 1 ml de PBS
- ensuite 1ml de solution de coloration est ajouté dans chaque puits
- on laisse colorer pendant 12 à 16 heures à l'étuve à 37°C
- l'absorbance de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Packard SpectraCount, U.S.A.).

3.5. Effet des stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1.

3.5.1. Matériels.

- BME: (Gibco, Grande-Bretagne).
- TNF- α : (N° 210-TA, R&D Systems Europe, Grande-Bretagne), dilué dans du BME pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- IL-1 α : (N° 200-LA, R&D Systems Europe, Grande-Bretagne), dilué dans du BME pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- IL-1 β : (Janssen Biochemica, Belgique), dilué dans du BME pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- BME + SB 10%: Milieu BME additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).

3.5.2. Méthodes.

Les cellules sont repiquées dans des plaques multi-puits à 80000 cellules/puits; des triplicats sont réalisés.

A partir du lendemain, elles sont soumises à 5 stimulations successives d'une heure au TNF- α et à l'IL-1 α et β . On laisse un laps de temps de 24 heures entre les stimulations. Après chaque stimulation, les puits contenant les cellules sont rincés au BME puis on replace du milieu de culture frais additionné de

10% de sérum. On étudie ensuite leur morphologie et le pourcentage de cellules présentant une activité β -gal associée à la sénescence.

3.6. Mesure de l'effet de stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1 sur le vieillissement accéléré par détermination des morphotypes.

3.6.1. Matériels.

- Boîtes de Pétri: stériles et de 35 mm de diamètre (Falcon, U.S.A.).
- PBS: tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, pH 7,4.
- Ethanol 70%: (Merck, Allemagne).
- Solution de fixation: paraformaldéhyde (Merck, Allemagne) à 3,7% dans du PBS (à faire bouillir sous hotte pour dissoudre).
- Solution de coloration: Bleu de Coomassie:
 - 50 mg de colorant (Janssen Biochemica, Belgique) dilué dans 4,7 ml d'acide acétique (Janssen Biochemica, Belgique).
 - 22,7 ml d'éthanol absolu.
 - 22,7 ml d'eau distillée.

3.6.2. Méthodes.

Dans le but de déterminer les différents types morphologiques des fibroblastes, ceux-ci sont repiqués à la très faible densité de 700 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri préalablement quadrillées.

Un jour après le repiquage, les cellules sont d'abord rincées deux fois au PBS et ensuite fixées pendant 10 minutes.

On décante ensuite la solution de fixation et on y ajoute de l'éthanol 70% durant 10 minutes. Après l'avoir ôté, les boîtes sont séchées à l'étuve à 37°C.

La coloration des cellules est réalisée au Bleu de Coomassie pendant 30 secondes puis on rince les boîtes à l'eau distillée, avant de les faire sécher à 37°C.

Le comptage des différents morphotypes se fait à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

3.7. Effets de la présence d'un anti-oxydant lors de stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1.

3.7.1. Matériels.

- BME: (Gibco, Grande-Bretagne).
- N-acétyl-L-cystéine: (Sigma, U.S.A.).
- TNF- α : (N° 210-TA, R&D Systems Europe, Grande-Bretagne), dilué dans du BME pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- IL-1 α : (N° 200-LA, R&D Systems Europe, Grande-Bretagne), dilué dans du BME, pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- IL-1 β : (Janssen Biochemica, Belgique), dilué dans du BME pour une concentration finale de 10 ng/ml.
- BME + SB 10%: Milieu additionné de 10% de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).

3.7.2. Méthodes.

Il s'agit de réaliser 5 stimulations successives d'une heure à 24 heures d'intervalle, au moyen de TNF- α et d' l'IL-1 α et β . On ajoute de la N-acétyl-L-cystéine 5 mM au milieu de stimulation pour la moitié des puits. Après chaque stimulation, les cellules sont rincées au moyen de BME puis replacées dans du BME + SB 10%. On mesure ensuite l'effet des stimulations successives sur le vieillissement accéléré se référant au biomarqueur SA β -gal. Le protocole à suivre est le même que celui décrit au point 3.3. pour les stress successifs.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

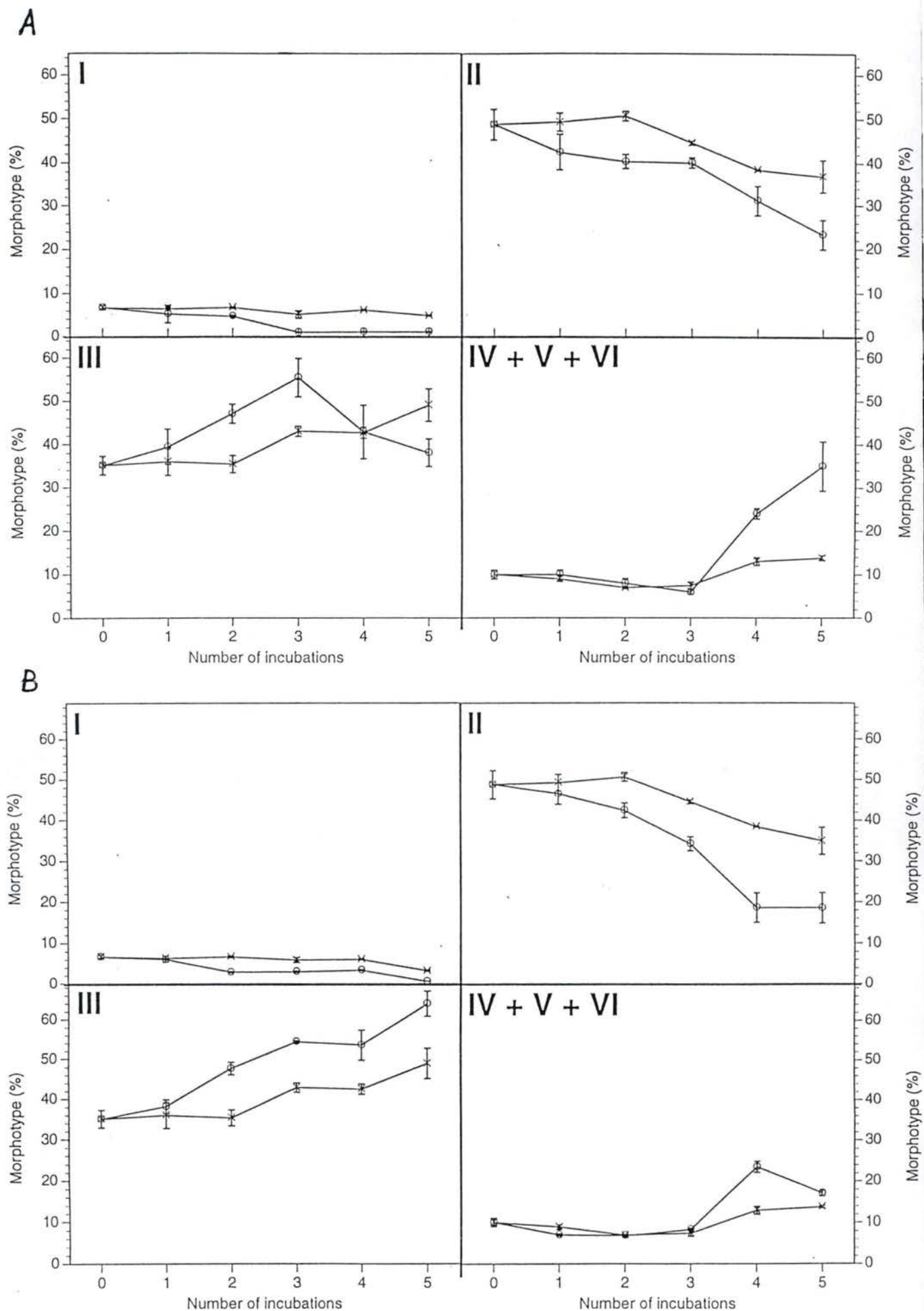


Figure III-1. Effets de stimulations successives à l'IL-1 α (A) et au TNF- α (B) sur la proportion de morphotypes I, II, III, IV + V + VI. (o: cellules stimulées à l'une de ces cytokines, x: contrôle après incubations sans cytokine)

1. Etude du vieillissement accéléré.

1.1. Effet de stimulations successives par des cytokines sur les biomarqueurs du vieillissement.

1.1.1. Stimulations au TNF- α et à l'IL-1.

1.1.1.1. Effets sur le biomarqueur « morphotypes ».

Les concentrations en TNF- α et IL-1 α utilisées dans cette expérience sont telles qu'elles ne provoquent aucune cytotoxicité et ne sont pas pro-prolifératives, à savoir 10 ng/ml pour les deux types de cytokines (Dumont, en préparation).

Par rapport au contrôle, une diminution de la proportion de morphotypes I et II est observée au fur et à mesure des stimulations à l'IL-1 α . D'autre part, les proportions de morphotypes III augmentent jusqu'à la troisième stimulation puis décroissent en faveur des proportions cumulées de morphotypes IV+V+VI, qui augmentent fortement après les quatrième et cinquième stimulation. On considère ici les proportions des morphotypes IV+V+VI comme étant un ensemble car elles représentent le compartiment post-mitotique de la culture de fibroblastes. Les proportions de morphotypes observées pour le contrôle correspondent à celles observées classiquement. Les morphotypes VII furent très rarement observés car ils sont dégénératifs et ont donc une durée de vie limitée.

Les résultats obtenus par des stimulations successives au TNF- α sont semblables aux précédents, c'est-à-dire une diminution des morphotypes I et II et une augmentation des proportions de morphotypes âgés III à VI. Dans ce cas cependant, les effets sur les morphotypes II et III sont observés tout au long des 5 stimulations. (figure III-1.)

1.1.1.2. Discussion.

Considérant les résultats décrits ci-dessus, on peut tirer comme conclusion de cette expérience que les stimulations successives des fibroblastes au moyen de TNF- α et d'IL-1 α ont pour effet d'accélérer le processus de

	Témoins avant incubation	IL-1 α	IL-1 β	TNF- α	Contrôles incubés sans cytokine
Pourcentage de cellules colorées	17 \pm 4	23 \pm 2	18 \pm 2	31 \pm 4	17 \pm 1
Pourcentage de cellules colorées / témoins	100 a	135 b	106 b	182 b	100 b
Modification du pourcentage de cellules colorées / témoins (b-a)	0	35	6	82	0

Figure III-2. a) Résultats obtenus par des stimulations successives à l'IL-1 α ou β ou au TNF- α après détermination de la modification du pourcentage de cellules présentant une activité SA β -gal.

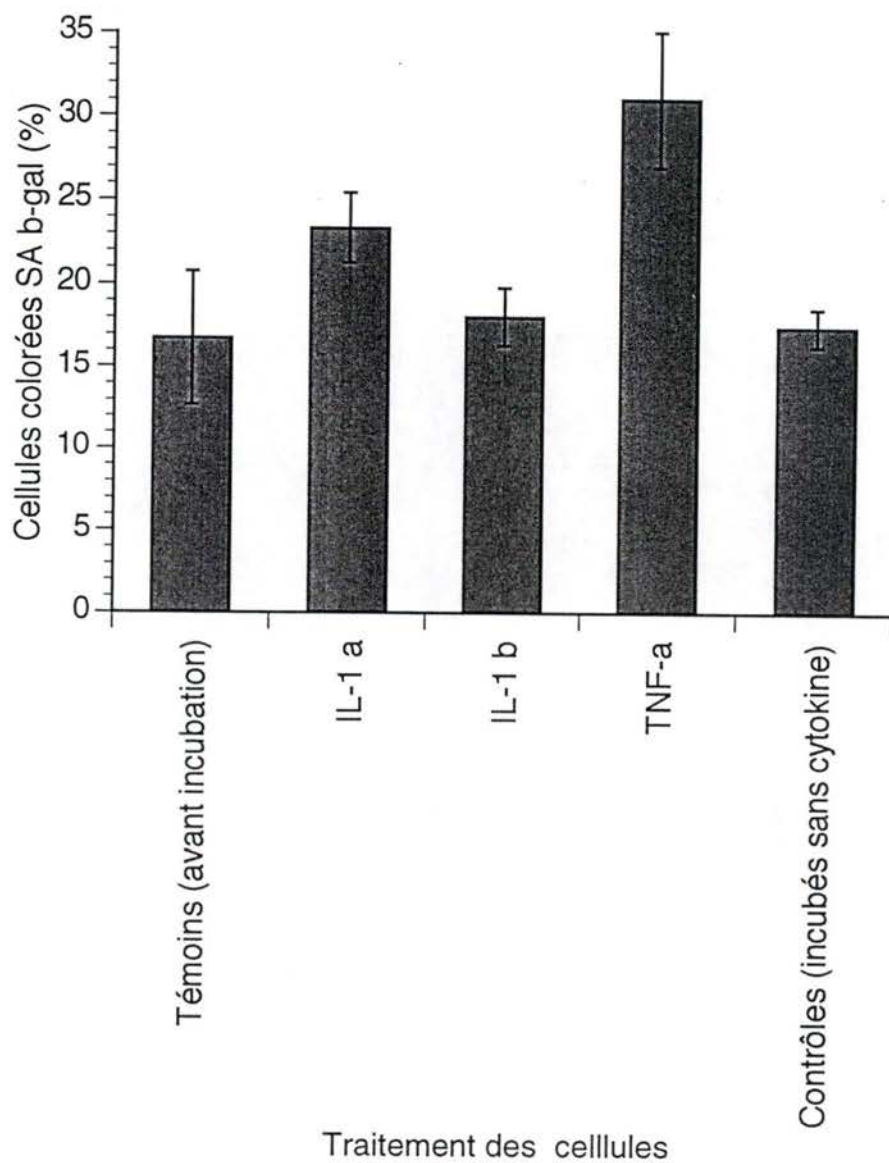


Figure III-2. b) Pourcentage de cellules présentant l'activité SA β -gal après 5 stimulations successives au TNF- α ou à l'IL-1 α ou β .

vieillissement. Comme expliqué dans l'introduction de ce mémoire, la voie de transduction du signal résultant de la stimulation cellulaire par ces cytokines passe par une libération accrue de radicaux libres. Ces espèces réactives sont donc à l'origine de l'accélération du vieillissement.

L'effet est parfaitement comparable à celui observé lors d'une exposition au tBHP, à cette différence près qu'un nombre plus élevé d'incubations avec les cytokines est nécessaire pour obtenir un changement de morphotypes semblable à celui observé lors d'expositions au tBHP. Le nombre de radicaux libres produits dans la cellule suite au stress au tBHP est en effet supérieur à celui engendré par les stimulations au TNF- α et à l'IL-1 α .

1.1.1.3. Effets sur l'activité β -galactosidase liée à la sénescence (SA β -gal).

Des stimulations successives au TNF- α et à l'IL-1 α ont été réalisées en vue d'étudier leur effet sur le biomarqueur SA β -gal. Les concentrations en cytokines utilisées sont toujours de 10 ng/ml. Dans ce type d'expérience, nous avons aussi testé l'effet de l'IL-1 β . Les résultats furent les suivants, rapportés aux cellules contrôles.

- l'IL-1 β n'a aucun effet significatif d'accélération du vieillissement: la proportion de cellules présentant l'activité SA β -gal est similaire à celle du contrôle.

- l'IL-1 α provoque une augmentation de la proportion de cellules présentant l'activité SA β -gal de l'ordre de 35%.

- le TNF- α provoque une augmentation encore plus nette du nombre de cellules colorées, de l'ordre de 82%.

(figures III-2. a et b)

1.1.1.4. Discussion.

Comme pour les morphotypes, le TNF- α et l'IL-1 α ont un effet sur le biomarqueur SA β -gal, qui dépeint une accélération du vieillissement.

Le TNF- α provoque l'effet le plus important des trois cytokines testées dans cette expérience, contrairement à l'IL-1 β qui n'a aucune efficacité.

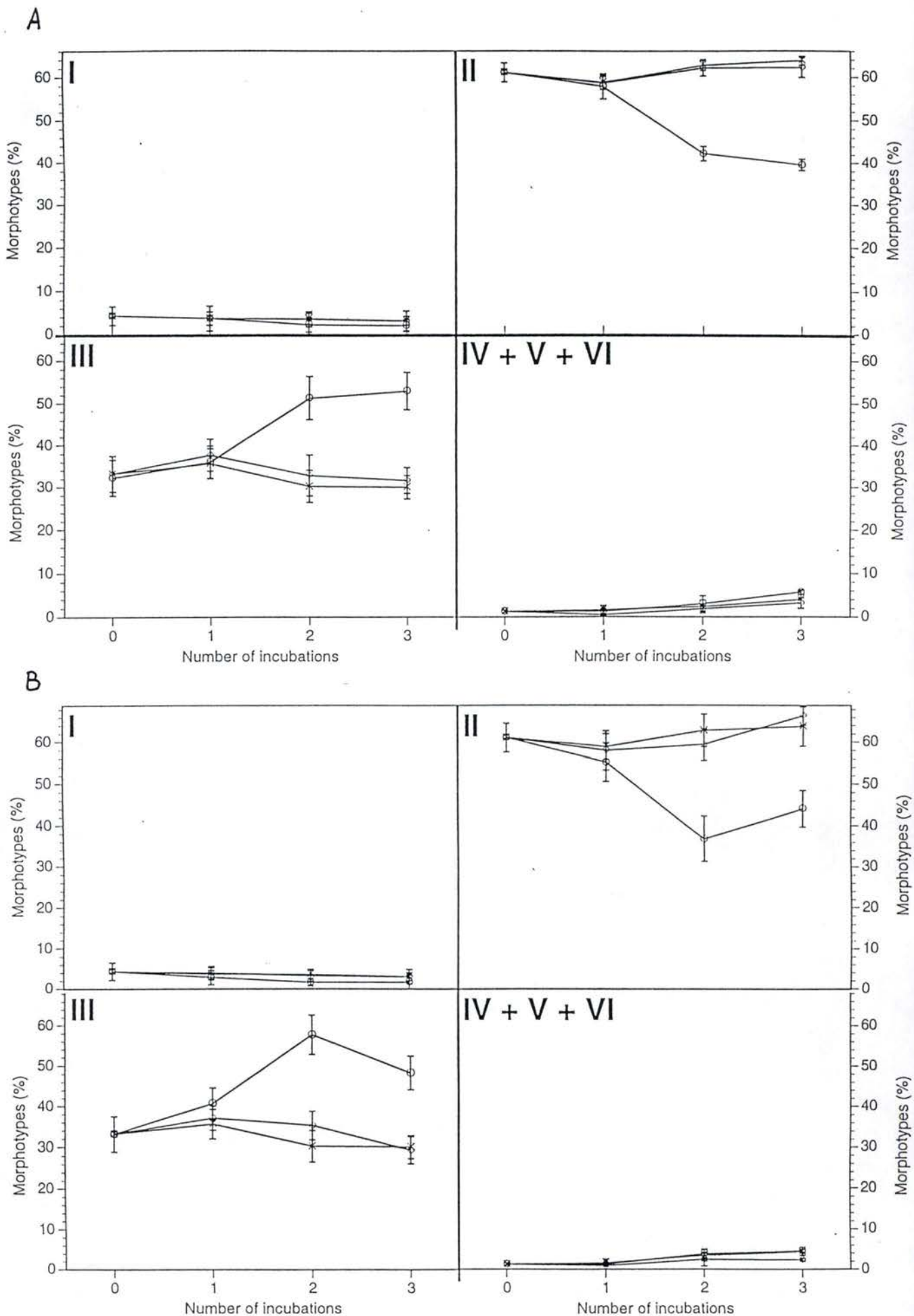


Figure III-3. Effets de 3 stimulations successives à l'IL-1 α (A) et au TNF- α (B) en présence de NAC sur la proportion de morphotypes I, II, III, IV + V + VI. (o: cellules stimulées à l'une de ces cytokines, ◊: cellules stimulées en présence de NAC, x: contrôle après incubations sans cytokine)

Le rôle des cytokines et le mécanisme développé dans le point précédent sont donc confirmés par cette deuxième expérience.

1.1.2. Effet de l'addition d'un composé antioxydant lors de stimulations au TNF- α et à l'IL-1 α .

S'appuyant sur le postulat que les voies de transduction du signal du TNF- α et de l'IL-1 α causent une libération de radicaux libres au sein de la cellule et que celle-ci est justement responsable de l'accélération du vieillissement cellulaire, nous avons testé l'effet potentiellement protecteur d'une molécule antioxydante, en particulier la N-acétyl-L-cystéine (NAC).

Les expériences ont été réalisées pour les deux biomarqueurs du vieillissement.

1.1.2.1. Effets sur le biomarqueur « morphotypes ».

Pour ces expériences, nous nous sommes limités à 3 stimulations successives. Premièrement, en présence de 10 ng/ml d'IL-1 α , on observe une très faible augmentation de morphotypes IV + V + VI car seulement 3 stimulations ont été réalisées. L'effet le plus spectaculaire est observé pour les morphotypes II qui diminuent de 20% environ et les morphotypes III qui augmentent de 20% environ.

On constate qu'en présence de l'antioxydant NAC à 5 mM, les proportions de morphotypes II et III après 3 incubations restent comparables à celles des contrôles non stimulés, contrairement aux populations subissant la stimulation en l'absence de l'antioxydant.

Des résultats similaires sont observés pour les stimulations au TNF- α 10 ng/ml en présence de NAC (figure III-3.).

Il est à noter que la proportion plus élevée de morphotypes I au début de l'expérience et par rapport à celle décrite au point 1.1.1. s'explique par une culture de départ plus âgée de 2 doublements de population.

1.1.2.2. Discussion.

Un rôle de protection de la N-acétyl-L-cystéine contre le vieillissement accéléré peut être dégagé de tels résultats. En effet, son addition au milieu de

	Témoins avant incubation	IL-1 α	IL-1 α + NAC	TNF- α	TNF- α + NAC	Contrôles incubés sans cytokine, sans NAC
Pourcentage de cellules colorées	23 \pm 1,5 a	45 \pm 2 c	44 \pm 2 c	54 \pm 1 c	44 \pm 1,5 c	30 \pm 1,5 b
Pourcentage de cellules colorées - différence (contrôle - témoin) (c - (b - a))	/	38 \pm 2 d	37 \pm 2 d	47 \pm 1 d	37 \pm 1,5 d	/
Rapport cytokine / témoins (d/a) (%)	/	165,2 f	160,9 e	204,3 f	160,9 e	/
Différence (cytokine + NAC) - (cytokine) (e-f)			- 4,3		- 43,4	

Figure III-4. a) Différences obtenues après 3 stimulations successives à l'IL-1 α ou au TNF- α en présence et absence de N-acétyl-L-cystéine (NAC) après détermination du pourcentage de cellules présentant une activité SA β -gal.

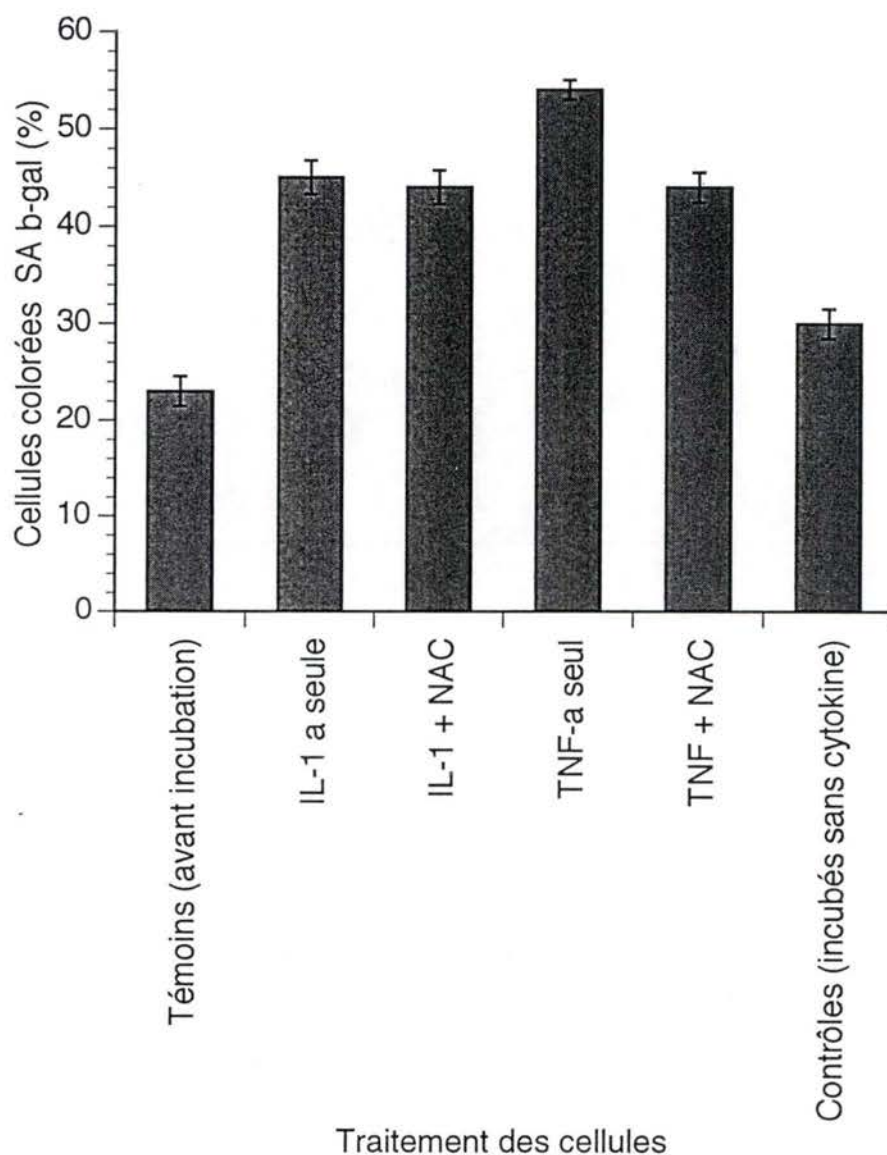


Figure III-4. b) Pourcentage de cellules présentant l'activité SA β-gal après 3 stimulations successives au TNF-α ou à l'IL-1 α en présence ou absence de NAC.

stimulation ralentit la progression vers les morphotypes âgés. A partir de là, un argument en faveur du mécanisme responsable du phénomène d'accélération du vieillissement par les stimulations au moyen de cytokines est apporté. Il s'agit bien de la libération accrue de radicaux libres provenant de la voie de transduction du signal qui en est responsable. La N-acétyl-L-cystéine a été choisie car il s'agit d'un antioxydant hydrophile capable de pénétrer dans le cytoplasme et donc d'y interférer avec les voies de transduction du signal des cytokines testées.

1.1.2.3. Effets sur le biomarqueur « SA β -gal ».

Par rapport au témoin, on observe une augmentation de la proportion de cellules colorées de 65,2 et 104,3% dans les populations stimulées 5 fois à l'IL-1 α ou au TNF- α respectivement.

En présence de NAC, la proportion de cellules présentant l'activité SA β -gal diminue faiblement (4,3%) par rapport à la valeur observée pour la stimulation à l'IL-1 α seule. En présence de TNF- α + NAC, cette proportion chute de 43,4% par rapport à la valeur obtenue après stimulations avec le TNF- α seul (figures III-4. a et b).

On note qu'il y a, pour cette expérience, des pourcentages plus élevés de cellules colorées par rapport à la totalité des cellules, ceci étant à rapprocher du fait que les cellules de départ avaient 3 passages en culture de plus que celles utilisées pour l'expérience précédente de coloration β -gal, et donc une proportion plus élevée de cellules présentant cette activité β -gal. Cette élévation correspond tout à fait aux différences habituellement observées en fonction des passages en culture.

1.1.2.4. Discussion.

Un effet protecteur très important de la NAC est trouvé si on compare les résultats après 3 stimulations en présence de TNF- α : on retrouve beaucoup moins de cellules présentant une activité SA β -gal. Cet effet peut être mis en relation avec l'effet protecteur de la NAC contre le passage des cellules à des morphotypes plus tardifs ("âgés").

Un effet protecteur beaucoup plus faible de la NAC est observé lorsqu'on compare les résultats après 3 stimulations en présence d'IL-1 α alors qu'un effet protecteur de la NAC très important avait été observé sur le passage des cellules aux morphotypes plus tardifs.

Le biomarqueur du vieillissement *in vitro* fourni par les morphotypes serait donc beaucoup plus sensible que la SA β -gal. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas une corrélation absolue entre le passage vers d'autres morphotypes et l'apparition de l'activité SA β -gal. Si près de 100% des morphotypes IV à VI possèdent cette activité, ce pourcentage tombe à 50% pour les morphotypes III, environ 15% pour les morphotypes II et 0% pour les morphotypes I (Dumont *et al.*, en préparation). Ces résultats montrent une forte hétérogénéité dans les morphotypes III en ce qui concerne cette activité enzymatique. De plus, plusieurs répétitions d'expériences où l'on déterminait la corrélation entre un morphotype donné et l'activité SA β -gal ne sont pas parvenues à réduire l'écart-type du pourcentage de morphotypes III présentant cette activité. Ceci témoigne de la variabilité intrinsèque existant dans ce morphotype III pour cette activité SA β -gal, ce qui n'était pas trouvé pour les autres morphotypes où la variabilité était très faible. Or, dans nos expériences nous observons surtout un passage de morphotypes II vers les morphotypes III.

Une faible différence d'intensité de stimulation pourrait donc facilement expliquer le fait que l'on obtient un pourcentage égal de morphotypes III après stimulation avec IL-1 α ou TNF- α et un pourcentage différent de cellules présentant une activité β -gal. Nos résultats vont dans le bon sens puisque la stimulation de cellules au TNF- α produit des modifications notables de la concentration intracellulaire en dérivés actifs de l'oxygène alors que la production de ces dérivés est beaucoup plus ténue lors de stimulations à l'IL-1 (Wong, G.H. *et al.*, 1989).

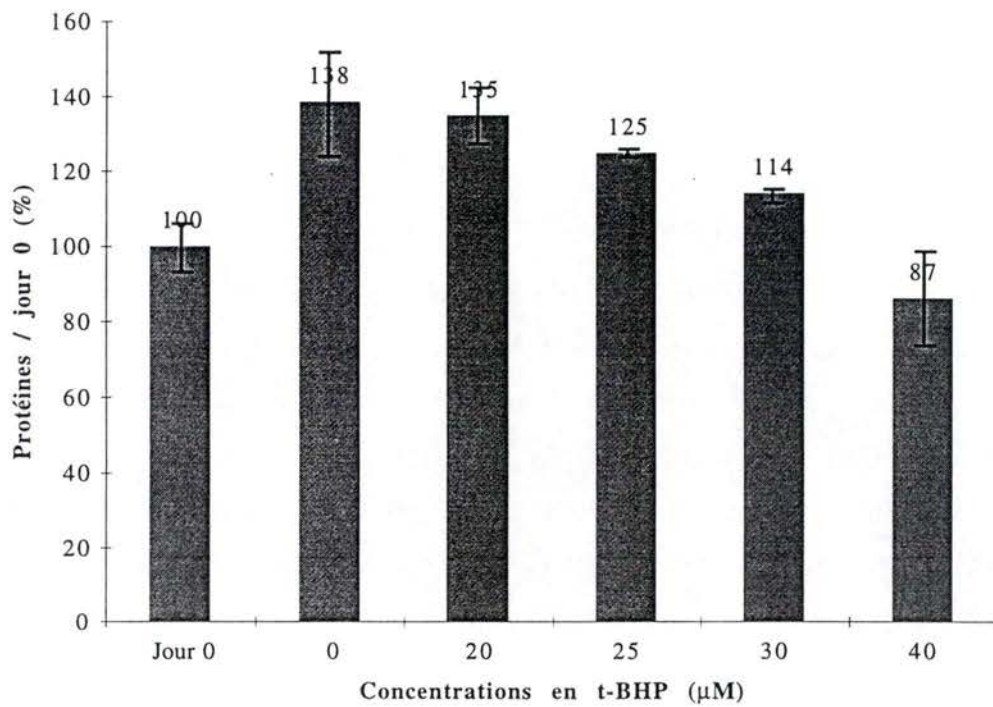


Figure III-5. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en tBHP après 5 stress successifs à raison d'un stress par jour. Les résultats sont exprimés en pourcentages de protéines par rapport à la quantité de protéines présentes au jour 0, avant toute incubation contrôle ou stress.

1.2. Effet de stress successifs au tBHP sur les biomarqueurs du vieillissement.

1.2.1. Mise au point préliminaire: détermination de la concentration en tBHP à utiliser.

Pour que les stress successifs puissent accélérer le vieillissement, ils ne doivent pas provoquer de mort cellulaire. La concentration en molécule stressante à adopter doit donc être suffisante pour avoir un effet décelable sur les biomarqueurs du vieillissement sans être cytotoxique.

Nous avons donc réalisé des stress successifs d'une heure par jour pendant 5 jours de suite sous des concentrations croissantes en tBHP.

1.2.1.1. Résultats.

Le taux de survie cellulaire est mesuré par un dosage de leur contenu en protéines un jour après le stress au moyen de la méthode de Folin. Cette méthode a été précédemment comparée à d'autres méthodes (comptage de cellules, mesure de l'activité hexosaminidase ou succinate déshydrogénase à l'aide de sels de tétrazolium (MTT)) et donne des résultats similaires. Cette méthode n'est pas assez sensible pour déceler des modifications du taux de synthèse protéique cellulaire et peut donc donner une estimation du nombre de cellules. Nous attendons 24 heures après le stress avant de doser les protéines pour que les débris des cellules mortes se détachent des puits des boîtes de culture.

On considère le contrôle du jour 0 comme représentant 100%. On constate que les témoins non stressés ont continué à se diviser pendant les 5 jours, de même que les cellules ayant subi des stress sous 20, 25 et 30 μM de tBHP, mais dans une moindre mesure. Par rapport au jour 0, on n'observe pas encore de mortalité après 5 stress sous tBHP 30 μM . Par contre, les cellules stressées par 40 μM de tBHP n'ont quant à elles pas continué à pousser et présentent même une faible mortalité (figure III-5.).

1.2.1.2. Discussion.

La plus forte concentration (40 μM) semblant cytotoxique dans nos conditions de stress en plaque multi-puits, nous avons utilisé des stress successifs sous 30 μM en tBHP qui n'est pas cytotoxique et qui présente de bonnes chances d'avoir un effet sur le vieillissement des cellules.

1.2.2. Stress au tBHP et SA β -galactosidase.

Il existe une technique fiable de quantification de l'activité SA β -galactosidase d'une population de cellules. Il s'agit du dénombrement de cellules à très faible confluence, fixées et colorées pour cette activité, comme décrit au point 3.3. de la partie matériels et méthodes et utilisée dans les précédentes expériences.

Cependant, cette technique nécessite un comptage rigoureux de la part de l'expérimentateur et est fastidieuse.

Nous avons donc tenté de mettre au point une technique alternative de mesure de l'activité SA β -galactosidase, au moyen d'une coloration en puits et d'une lecture de l'absorbance du bleu au spectrophotomètre (cf. matériels et méthodes, point 3.4.). Il est à noter que les résultats obtenus par cette technique doivent impérativement être rapportés au dosage de la quantité de protéines qui reflète le nombre de cellules par puits.

Notre démarche a été la suivante: il s'agissait de comparer l'efficacité des deux techniques pour une même expérience de stress successifs. Ceux-ci ont été réalisés en présence ou absence d'un chélatant du Ca^{++} intracellulaire, le BAPTA-AM, afin de déterminer si celui-ci a un effet protecteur quant à l'accélération du vieillissement. Ces stress ont donc un double intérêt, d'une part d'élargissement à l'étude du métabolisme calcique en réponse aux stress (cf. point 2.2. de ce chapitre) et d'autre part de test pour la nouvelle technique par spectrophotométrie.

1.2.2.1. Résultats.

Premièrement, les résultats des comptages nous donnent comme valeurs pour les témoins avant stress, les cellules après 5 stress au tBHP 30 μM sans

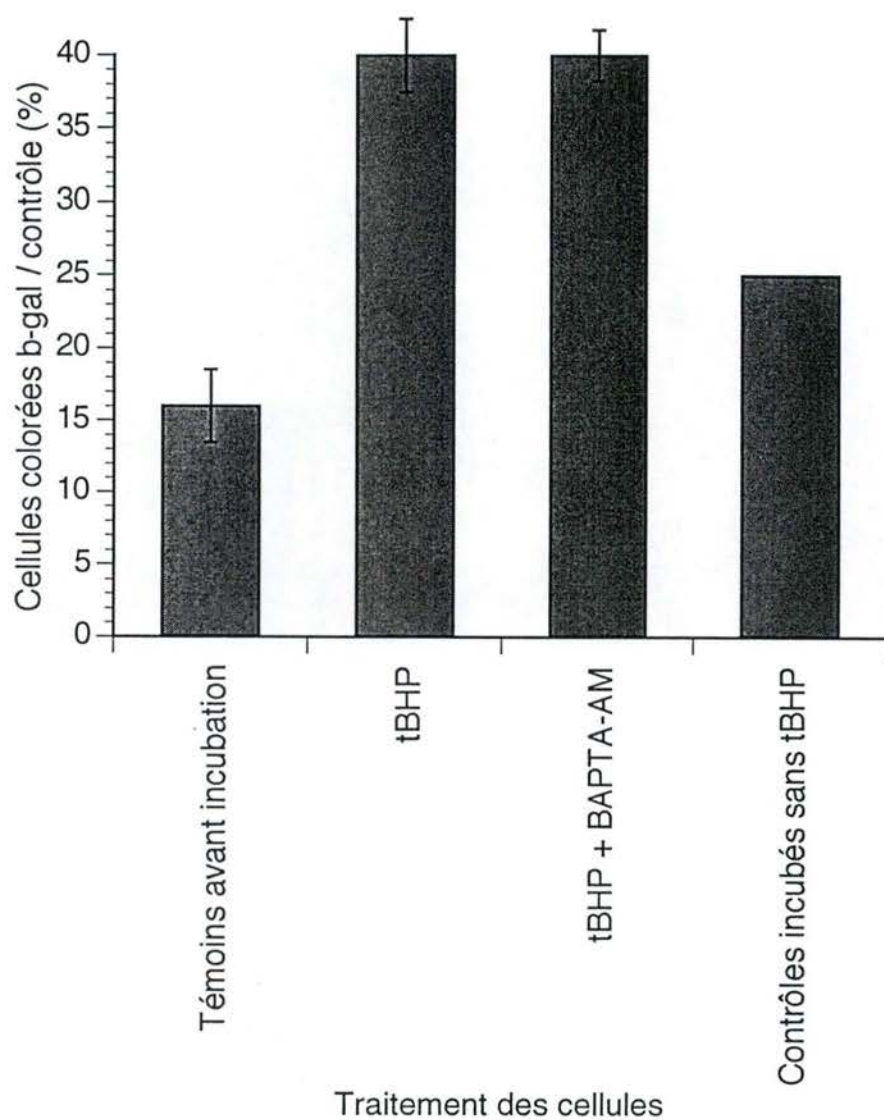


Figure III-6. Pourcentage de cellules présentant l'activité SA β -gal après 5 stress successifs au tBHP 30 μ M avec et sans BAPTA-AM.

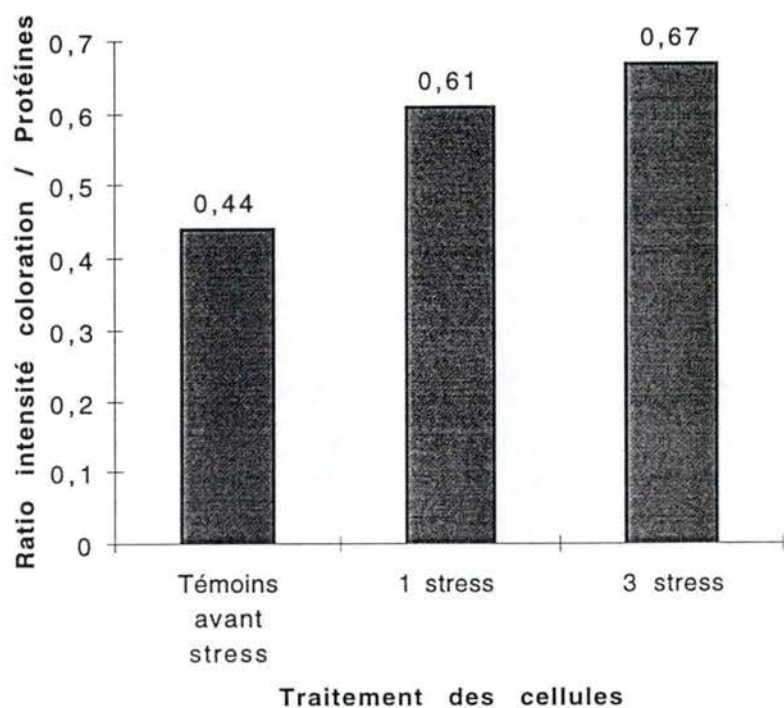


Figure III-7. Rapport entre la D.O. due à l'activité β -gal et la quantité de protéines après 3 stress successifs au tBHP en spectrophotométrie.

BAPTA-AM et avec BAPTA-AM, et les contrôles incubés sans tBHP, respectivement, 16, 40, 40 et 25% de cellules colorées par rapport à la totalité des cellules comptées dans chacun des cas.

Ceci correspond à un accroissement de la proportion de cellules colorées par rapport au témoin (considéré alors comme 100%) de 150% après les stress sous tBHP avec et sans BAPTA-AM (figure III-6.).

Deuxièmement, par la technique de lecture en puits, les résultats sont donnés par le ratio de l'intensité de la coloration bleue / quantité de protéines de chaque test et sont présentés à la figure III-7. On passe d'un rapport de 0,44 à un rapport de 0,67, du témoin de départ au 3ème stress, le contrôle incubé sans tBHP restant à une valeur très basse proche du témoin.

1.2.2.2. Discussion.

Les résultats nous apportent deux types d'information.

D'une part, la technique de mesure de la coloration β -gal par lecture en puits ne pose pas de problème, comme mis en évidence dans les résultats obtenus au cours de stress successifs. On observe une augmentation du rapport cellules colorées / mg de protéines, correspondant donc bien à l'augmentation du rapport cellules colorées / total des cellules en microscopie optique.

Par contre, si l'on augmente le nombre de stress au-delà de 3, on obtient des résultats artéfactuels: on retombe à des valeurs beaucoup plus basses que le témoin de départ, que ce soit pour les cellules stressées ou les cellules contrôles non stressées. Ces résultats ont été obtenus trois fois de suite et ne correspondent pas aux résultats obtenus par comptage de cellules. Les cellules les plus "âgées" sont elles moins bien attachées et auraient-elles pu disparaître suite aux différents traitements de rinçages, etc., expliquant une baisse importante de la proportion de cellules présentant une activité β -gal?

Lors d'une Gordon Conférence sur le vieillissement, en mai 98, nous avons appris que le critère activité β -gal à pH 6 devait être considéré avec prudence, vu qu'il apparaît lorsque les cellules sont stressées ou âgées mais aussi lorsque les cellules sont confluentes (d'où le test de β -gal sur cellules cultivées à faible densité, et comptage en microscopie, pour éviter la confluence). Personne ne sait si l'activité β -gal à pH 6 qui apparaît dans les

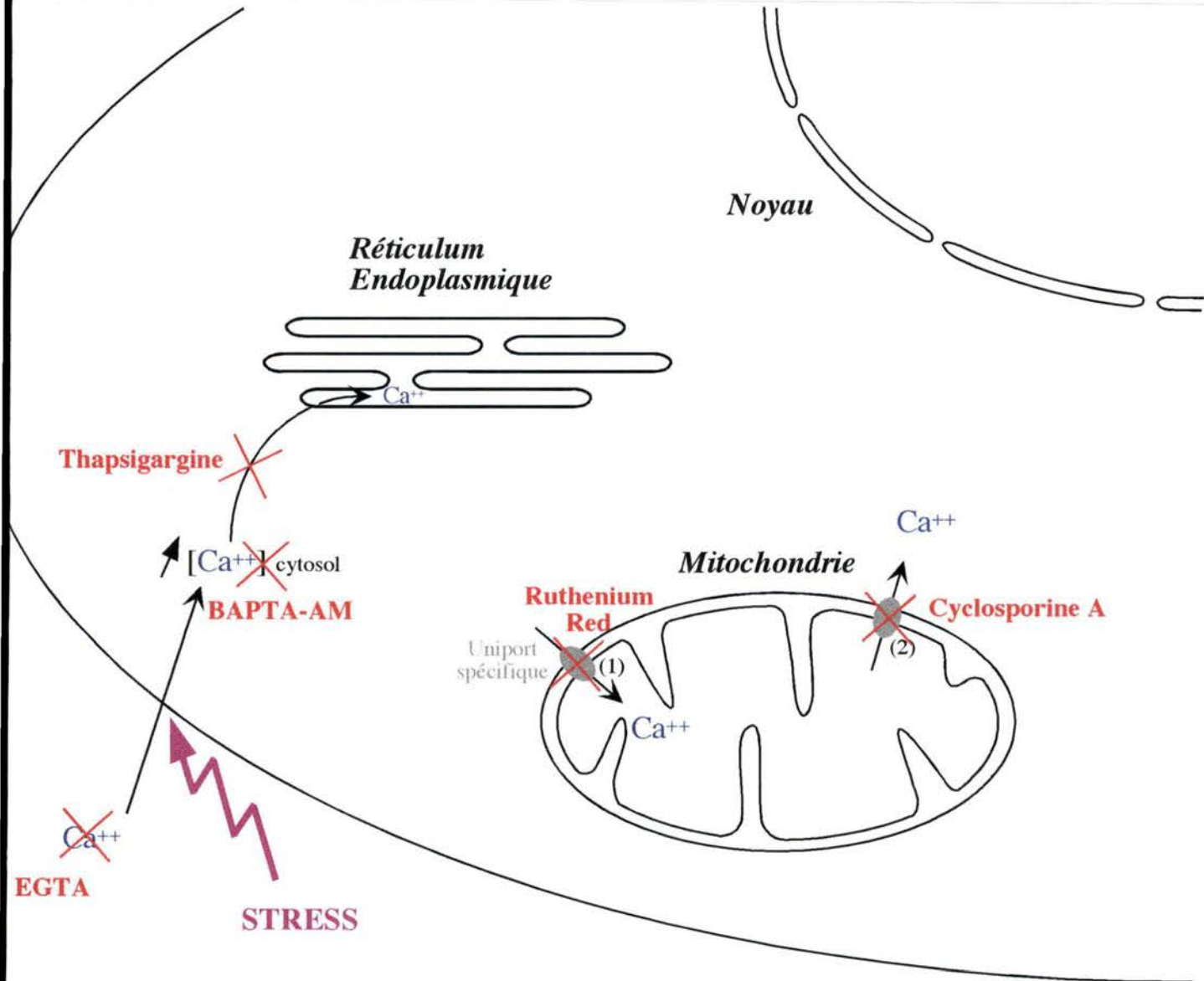


Figure III-8. Schéma expliquant le rôle des inhibiteurs utilisés. L'EGTA chélate le Ca^{++} extracellulaire, le BAPTA-AM chélate le Ca^{++} intracellulaire; la thapsigargine empêche le pompage du Ca^{++} par le réticulum endoplasmique. Le Ruthenium Red inhibe l'uniport mitochondrial spécifique du Ca^{++} , et la cyclosporine A inhibe la libération de Ca^{++} par l'antiport $\text{Ca}^{++}/2\text{H}^{+}$.

cellules confluentes reste stable ou non. De plus, après 4 ou 5 stress successifs, rien ne dit qu'une partie des cellules ne peut mourir et être remplacée par des cellules qui se divisent. Etant donné qu'on sait que les cellules âgées sont les plus sensibles aux stress, rien d'étonnant à ce que la proportion de cellules présentant l'activité β -gal à pH 6 diminuerait si une partie des cellules disparaissait suite aux stress. Dans ce cas, on ne peut pas expliquer pourquoi on n'obtient pas ce phénomène lorsque l'on compte les cellules positives pour la SA β -gal en microscopie; ceci laisse présager un problème dû au mode opératoire lorsque l'on réalise le dosage en spectrophotométrie. En tout cas, on n'observe pas de modification de la quantité de protéines cellulaires après 5 stress. En conclusion, ce test en spectrophotométrie fonctionne bien pour autant qu'on n'aille pas au-delà de 3 stress successifs.

D'autre part, on constate la même tendance par l'une et l'autre technique concernant l'effet du BAPTA-AM face aux stress provoquant un vieillissement accéléré à savoir que ce chélatant du Ca^{++} intracellulaire ne semble pas protéger les cellules contre le vieillissement accéléré par les stress si l'on se réfère à ce biomarqueur.

2. Etude du rôle du métabolisme calcique en réponse à des stress sous tBHP causant une mortalité cellulaire.

Comme exposé dans l'introduction de ce mémoire, en cas de stress radicalaire un mécanisme de cycle calcique intracellulaire est déclenché dans des nombreux types cellulaires. Les conséquences de ce phénomène sont vraisemblablement très dommageables pour la cellule et interviennent dans le processus de mort par nécrose.

La démarche expérimentale qui suit entre dans le cadre d'une étude des différentes étapes modifiant la concentration intracellulaire en Ca^{++} au cours de la réponse cellulaire au stress. Nous allons donc tenter de disséquer cette voie en testant divers inhibiteurs des flux de Ca^{++} agissant à diverses étapes

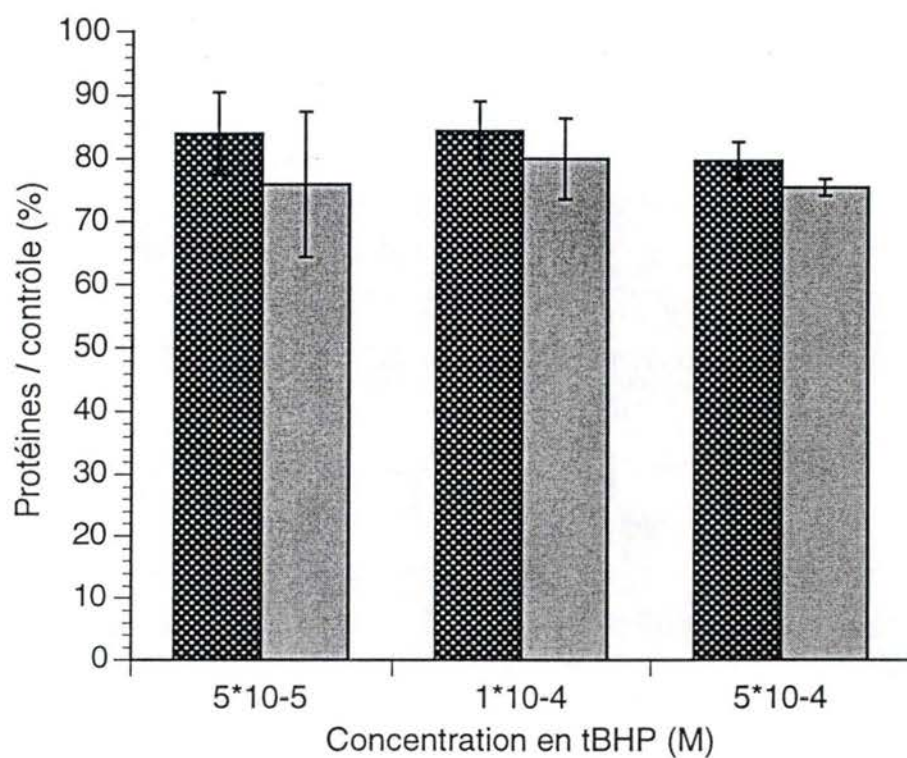


Figure III-9. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans EGTA (noir: sans EGTA, gris: avec EGTA).

clés de son cycle intracellulaire, et ce quant à leur effet dans la résistance aux stress (figure III-8.).

2.1. Effet de l'absence de Ca^{++} dans le milieu de stress.

La démarche première dans l'étude de la voie métabolique du calcium est d'empêcher une entrée de Ca^{++} extracellulaire pendant le stress. Pour ce faire, nous avons d'une part utilisé un chélatant du Ca^{++} , l'acide éthylène glycol - bis (β -Aminoéthyl éther) N, N, N', N' -tétraacétique ou EGTA, qui est placé dans le milieu de stress. La dose utilisée est équimolaire à la quantité de calcium intervenant dans la composition du milieu BME, à savoir 2 mM.

D'autre part, nous avons réalisé le stress dans un tampon contenant ou non du calcium. Il s'agit d'un tampon riche, l'HBSS, pour « Hank's Balanced Salt Solution ». Du D-glucose intervient normalement dans sa composition, toutefois nous avons choisi de le remplacer par du L-glucose afin d'éviter toute interférence de la part du D-glucose, qui protège effectivement contre les stress, avec l'effet éventuel du Ca^{++} extracellulaire, et ce afin de savoir si la présence de D-glucose ou non pouvait changer quelque chose.

2.1.1. Stress en présence du chélatant du Ca^{++} .

Nous réalisons le stress oxydatif au moyen des concentrations suivantes en tBHP: 50, 100 et 500 μM .

Les niveaux de survie cellulaire par rapport au contrôle, obtenus par dosage des protéines, montrent que la chélation du Ca^{++} extracellulaire n'a aucun effet significatif sur la survie des cellules à des stress tuant entre 15 et 20% des cellules, les valeurs étant très proches l'une de l'autre pour des stress d'intensité identique, avec et sans chélatant, avec une tendance à une plus grande cytotoxicité en présence d'EGTA (figure III-9.). Des stress à des concentrations plus élevées auraient peut-être permis de mettre en évidence une protection. Ces expériences sont envisagées. La suppression totale du Ca^{++} du milieu extracellulaire a peut-être des effets négatifs et positifs sur la survie cellulaire, certaines voies d'activation nécessitant peut-être du calcium pour protéger la cellule alors qu'un manque de Ca^{++} pourrait modifier les propriétés

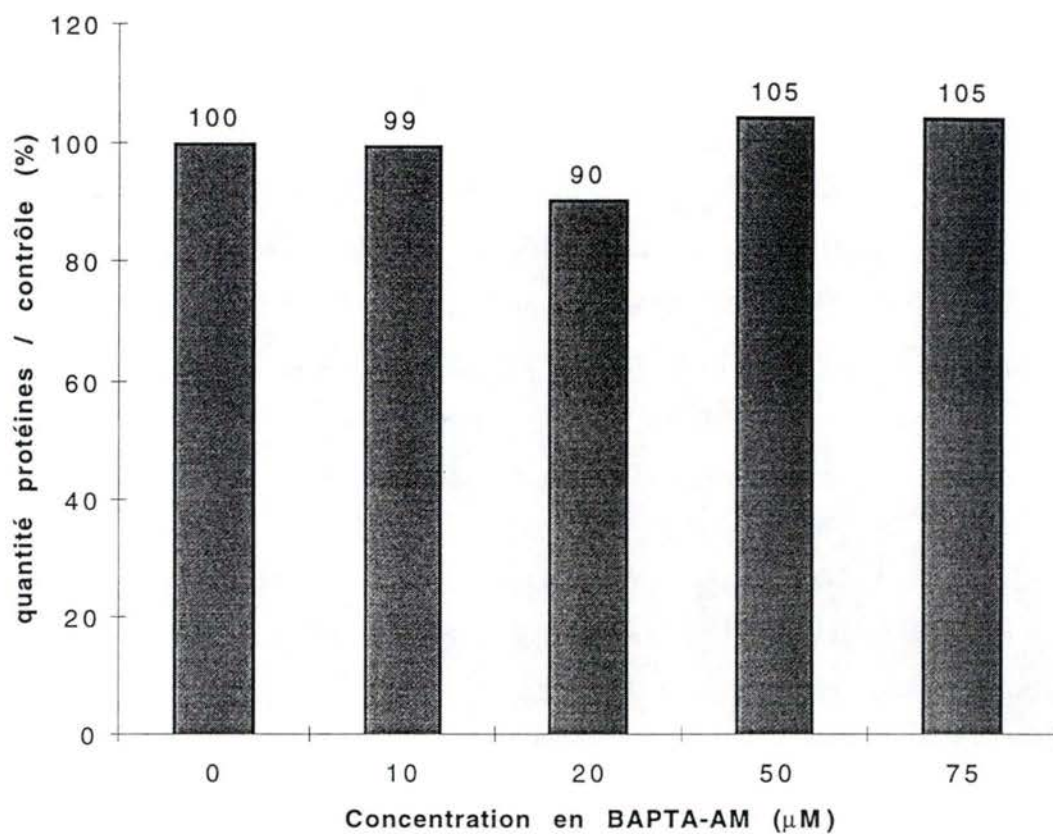


Figure III-10. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en BAPTA-AM obtenue après dosage des protéines cellulaires.

de la matrice extracellulaire, modifiant l'ancrage des cellules à leur substrat. Les stress réalisés dans l'HBSS donnent des résultats similaires, avec et sans D-glucose (non montré).

2.2. Effet de la présence d'un chélatant du Ca^{++} intracellulaire, le BAPTA-AM, dans le milieu de stress.

Afin de déterminer si le Ca^{++} intracellulaire joue un rôle effectif dans les dommages causés à la cellule lors d'un stress, nous utilisons un composé chélatant du Ca^{++} intracellulaire et capable de traverser les membranes plasmiques, l'acide 1,2 bis (2-Aminophénoxy) éthane- N, N, N', N'-tétraacétique tétrakis (Acétoxyméthyl ester) ou BAPTA-AM.

2.2.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en BAPTA-AM.

Préalablement à la réalisation de stress en présence d'un composé supplémentaire dans le milieu de stress, il est indispensable de déterminer à quelle concentration il va être utilisé, afin d'éviter tout effet cytotoxique de celui-ci au départ. On peut raisonnablement concevoir que ces molécules aient un effet néfaste sur la survie cellulaire s'ils sont utilisés à trop forte dose.

Une courbe de mortalité se réalise de la façon suivante: on incube des cellules avec du milieu contenant des concentrations diverses en BAPTA-AM (0, 10, 20, 50 et 75 μM), et ce pendant une heure afin d'être dans les mêmes conditions que celles du stress ultérieur sous tBHP et pour lequel cette mise au point est nécessaire.

Le lendemain, la survie cellulaire est déterminée par un dosage de protéines comme précédemment.

2.2.1.1. Résultats.

Quelle que soit la concentration en BAPTA-AM, la survie cellulaire reste aussi élevée (figure III-10.).

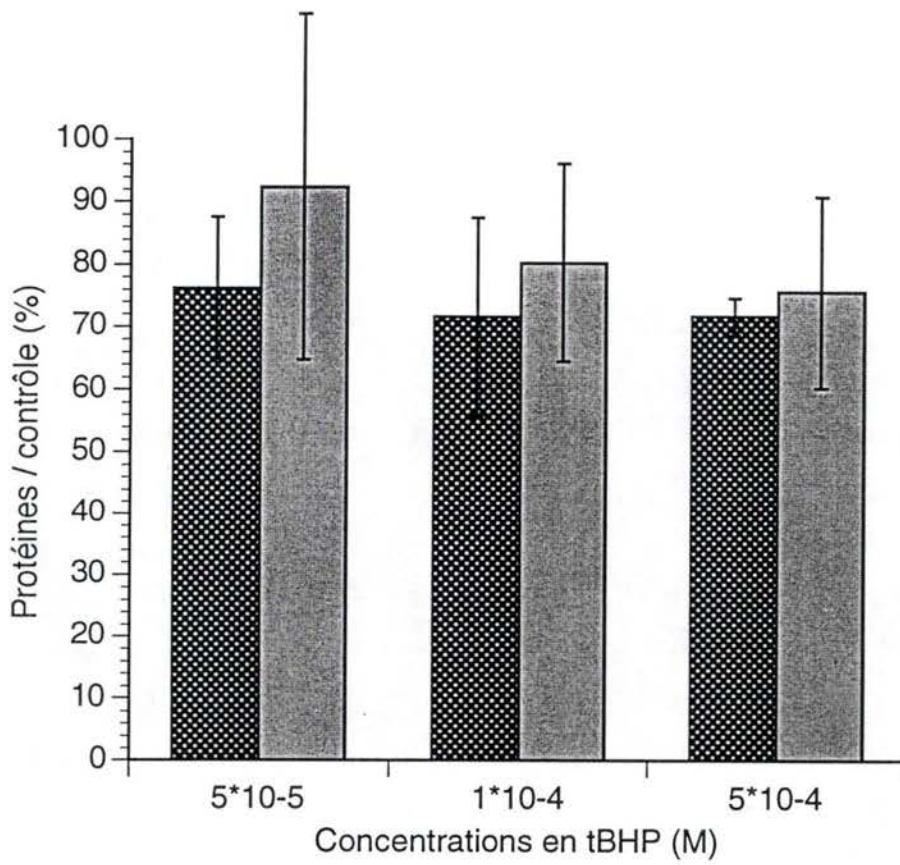


Figure III-11. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans BAPTA-AM (noir: sans BAPTA-AM, gris: avec BAPTA-AM).

2.2.1.2. Discussion.

Ce composé n'est donc pas cytotoxique aux concentrations auxquelles il a été testé.

2.2.2. Stress au tBHP en présence de BAPTA-AM et survie cellulaire.

Nous décidons d'utiliser une concentration de 75 μM en BAPTA-AM en vue d'augmenter les chances de détecter un effet de la présence de ce composé dans le milieu de stress.

2.2.2.1. Résultats.

Le stress a été réalisé sous trois concentrations différentes en tBHP, à savoir 50, 100 et 500 μM .

Les résultats obtenus dans les trois cas vont dans le sens d'un niveau de survie plus élevé pour les stress en présence de BAPTA-AM. On observe des différences de 16,1; 8,7 et 3,9% pour 50, 100 et 500 μM respectivement (figure III-11.).

2.2.2.2. Discussion.

Les écarts-types étant très élevés, aucune conclusion ne peut être tirée de manière définitive quant à un effet du BAPTA-AM et donc de la chélation du calcium intracellulaire dans le mécanisme de survie. Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois et de plus sur des cellules présentant un nombre élevé de passages en culture, ce qui a souvent des effets néfastes sur la variabilité lors de stress (non publié).

Quoi qu'il en soit, un effet protecteur semble exister, même s'il est faible. Des expériences supplémentaires devront être réalisées pour confirmer ou infirmer cette conclusion. Si cette protection est retrouvée lors d'expériences ultérieures, cela voudrait dire qu'une chélation, même partielle, du Ca^{++} libre intracellulaire pourrait protéger les cellules contre les stress sous tBHP, peut-être en agissant sur le métabolisme calcique mitochondrial.

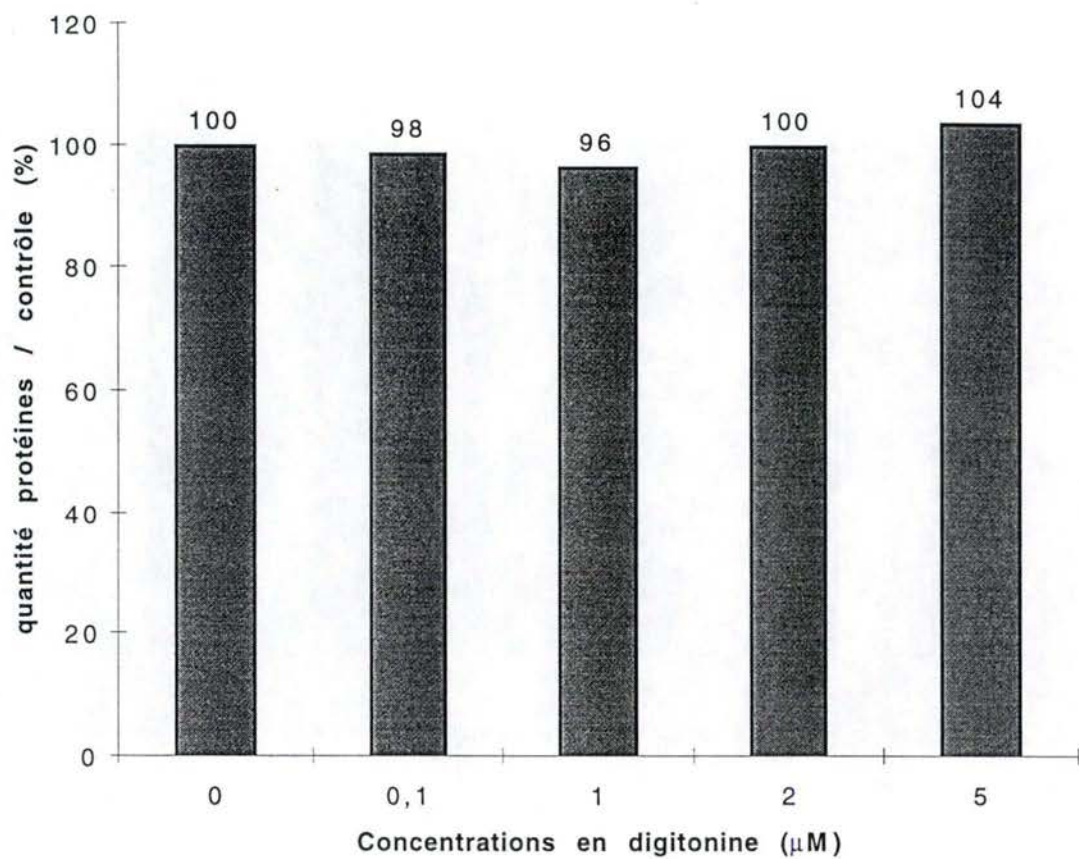


Figure III-12. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en digitonine obtenue après dosage des protéines cellulaires.

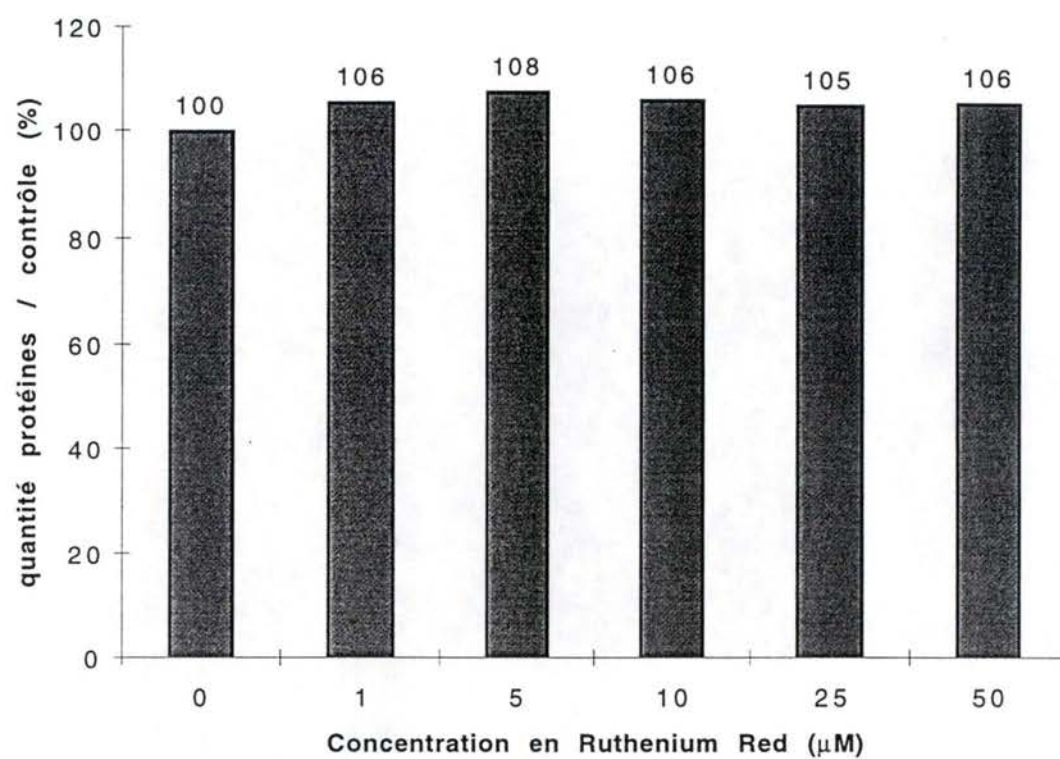


Figure III-13. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en Ruthenium Red obtenue après dosage des protéines cellulaires.

2.3. Etude du métabolisme calcique mitochondrial: rôle de la présence d'un inhibiteur de l'uniport de Ca^{++} mitochondrial dans le milieu de stress.

L'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale via un uniport spécifique, est inhibée par le Ruthenium Red. Pour qu'il entre dans la cellule et parvienne donc à son lieu d'action sur la membrane mitochondriale interne, la cellule doit être préalablement perméabilisée au moyen de digitonine, sans quoi la membrane plasmique est imperméable au Ruthenium Red.

Nous avons réalisé des courbes de mortalité pour l'un et l'autre composé afin de déterminer quelles concentrations utiliser lors du stress.

2.3.1. Courbes de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en digitonine et Ruthenium Red.

Quelles que soient les concentrations en digitonine testées (0,1; 1, 2 et 5 μM), le pourcentage de survie cellulaire évalué par rapport au contrôle est proche de la valeur 100% (voir mémoire de Licence d'A. Barez, FUNDP, Namur, 1997).

Pour le Ruthenium Red, le cas de figure est similaire, sachant que les concentrations testées sont 1, 5, 10, 25 et 50 μM (figures III-12 et 13.).

2.3.2. Stress au tBHP en présence de Ruthenium Red et digitonine et survie cellulaire.

Bien que ces molécules ne provoquent pas de mortalité cellulaire, nous allons utiliser pour notre expérience de stress les concentrations suivantes en inhibiteurs, à savoir la digitonine à 1 μM et le Ruthenium Red à 10 μM (Prof. Lemasters, University of North Carolina, U.S.A., communication personnelle).

2.3.2.1. Résultats.

Le stress a été réalisé sous 50, 100 et 500 μM de tBHP. Les pourcentages de survie cellulaire par rapport au contrôle pour ces différentes concentrations sont respectivement de 93,7; 86,2 et 76,7% dans du milieu de stress seul, et de

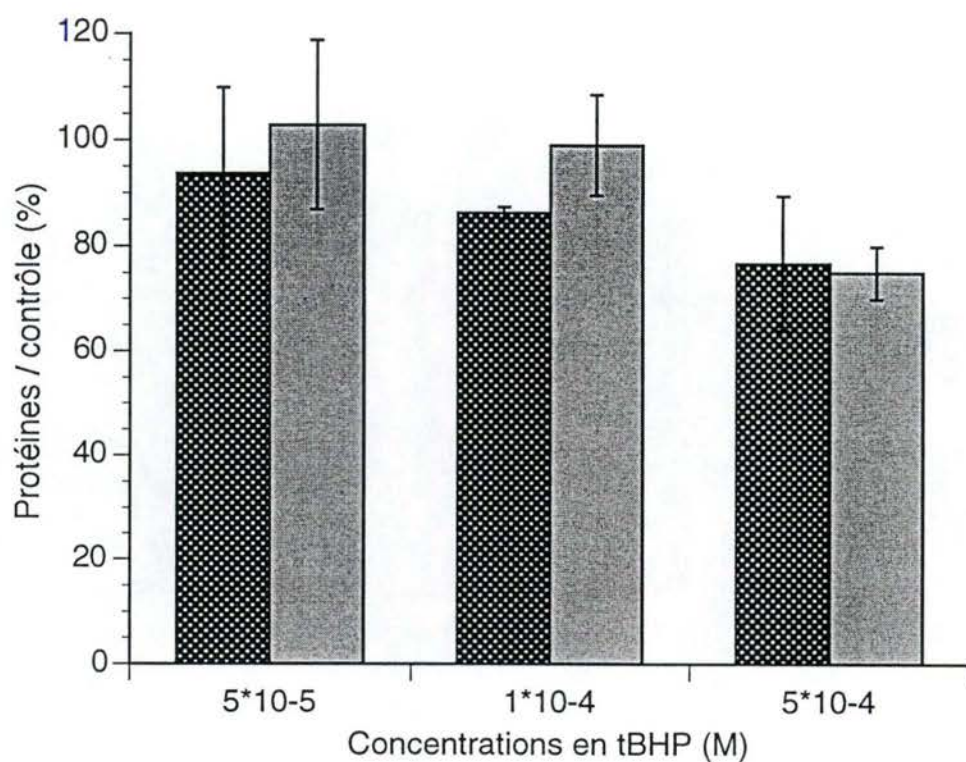


Figure III-14. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans digitonine + Ruthenium Red (noir: sans digitonine + Ruthenium Red, gris: avec digitonine + Ruthenium Red).

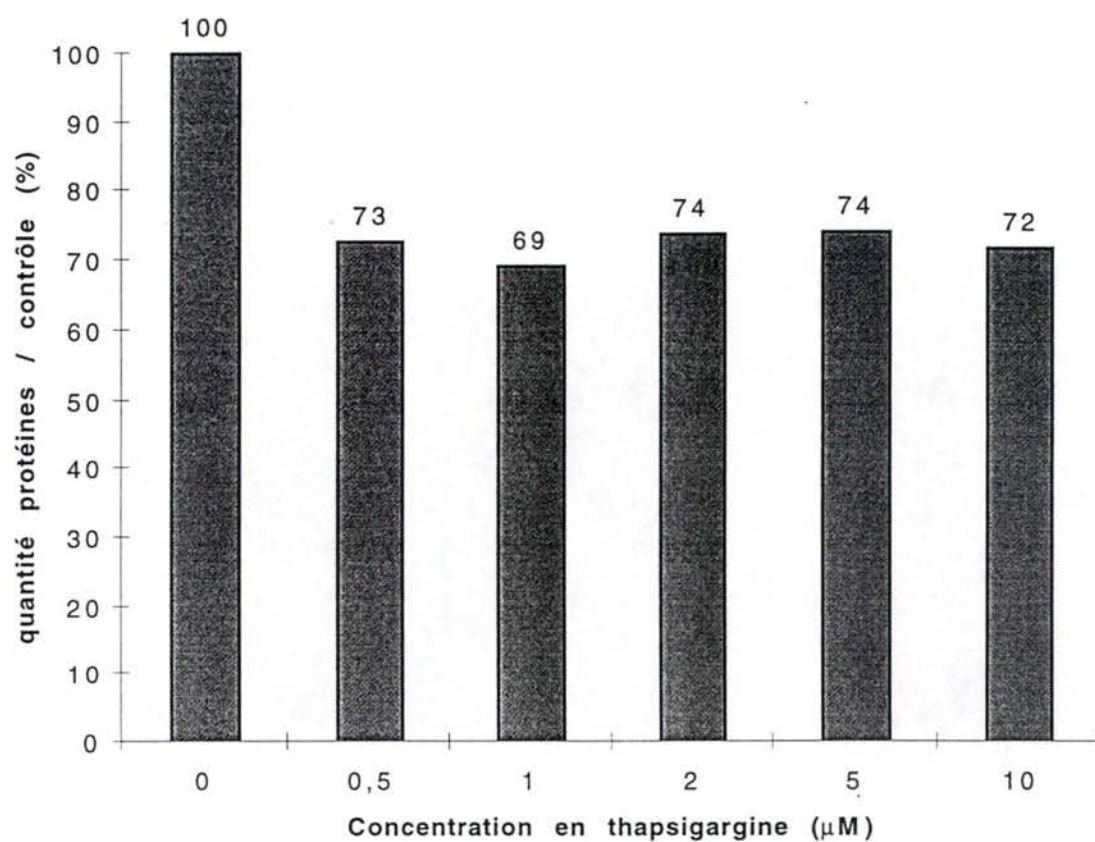


Figure III-15. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en thapsigargine obtenue après dosage des protéines cellulaires.

102,8; 99,0 et 74,9% avec ajout de digitonine/RutheniumRed au même milieu (figure III-14.).

2.3.2.2. Discussion.

Un effet protecteur est trouvé à 50 et 100 μM en tBHP, toutefois un test t de student nous permet de dire que cet effet protecteur n'est significatif qu'à 100 μM en tBHP. Aucune protection n'est observée à 500 μM .

Pour améliorer les effets de protection obtenus, il faudrait jouer sur les concentrations respectives en digitonine et en Ruthenium Red.

2.4. Rôle du réticulum endoplasmique dans le cycle du calcium: étude en présence d'un inhibiteur de l'uniport de Ca^{++} par cet organite dans le milieu de stress.

Etant donné que le réticulum endoplasmique est un organite communément impliqué dans le stockage de Ca^{++} , il est judicieux de prendre en compte son rôle éventuel dans l'étude du métabolisme calcique en situation de stress.

Pour ce faire, nous utilisons un inhibiteur de l'entrée de Ca^{++} dans le réticulum, à savoir la thapsigargine.

2.4.1. Courbes de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en thapsigargine.

Les concentrations suivantes en thapsigargine ont été testées: 1/2, 1, 2, 5 et 10 μM , avec pour chacune un pourcentage de survie cellulaire par rapport au contrôle proche de 100 % (figure III-15.). La thapsigargine ne présente aucun effet cytotoxique à ces concentrations dans ces conditions d'incubation d'une heure.

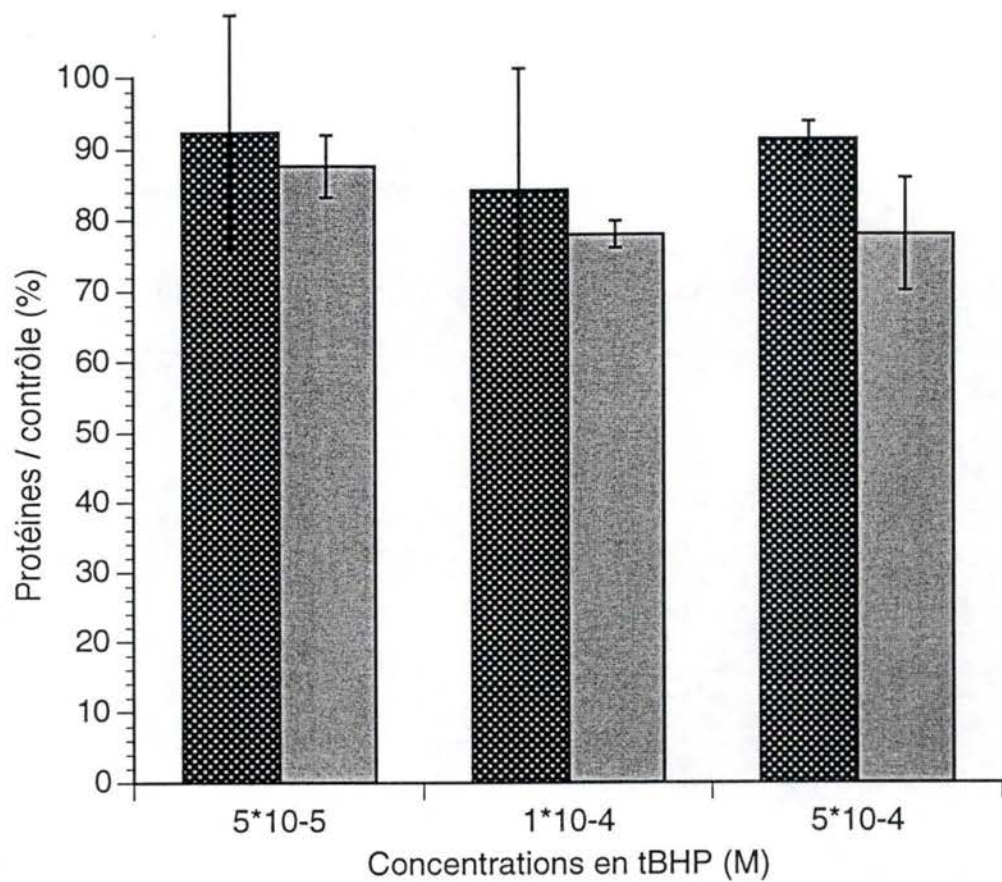


Figure III-16. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans thapsigargin (noir: sans thapsigargin, gris: avec thapsigargin).

2.4.2. Stress au tBHP en présence de thapsigargine et survie cellulaire.

La concentration en thapsigargine que nous avons décidé d'adopter pour le stress est de 5 μM (Prof. Lemasters, University of North Carolina, U.S.A., communication personnelle).

2.4.2.1. Résultats.

Les concentrations en tBHP utilisées lors de ce stress sont les mêmes que celles des stress précédents, et ce par souci de cohérence.

Les pourcentages de survie cellulaire observés respectivement pour 50, 100 et 500 μM de tBHP seul sont proches des valeurs rencontrées pour le même stress en présence de thapsigargine. On note toutefois une faible diminution (4,7; 6,3 et 13,4%) de la quantité de cellules survivantes pour les trois concentrations en molécule stressante lorsque le milieu contient l'inhibiteur de l'uniport de Ca^{++} (figure III-16.).

2.4.2.2. Discussion.

Les résultats ne mettent en évidence aucun rôle protecteur de la thapsigargine. Ils vont plutôt dans le sens d'un effet inverse bien que les valeurs ne soient pas significatives, compte tenu des écarts-types, et donc ne permettent de tirer aucune conclusion fiable.

Une explication peut être avancée facilement. Sachant que la thapsigargine inhibe la prise de Ca^{++} cytosolique par le réticulum endoplasmique, cet organite ne peut pas jouer le rôle de tampon envers l'entrée de Ca^{++} survenant dans la cellule lors du stress. Le cycle calcique intracellulaire poursuit son cours en passant par la mitochondrie et dès lors il y aurait une aggravation de l'effet de stress menant à une moindre survie des cellules.

2.5. Etude l'inhibition du relargage du Ca^{++} par la mitochondrie par la cyclosporine A.

La cyclosporine A (CSA) est l'inhibiteur spécifique de l'antiport $\text{Ca}^{++}/2\text{H}^{+}$ responsable du relargage du calcium par les mitochondries après un stress.

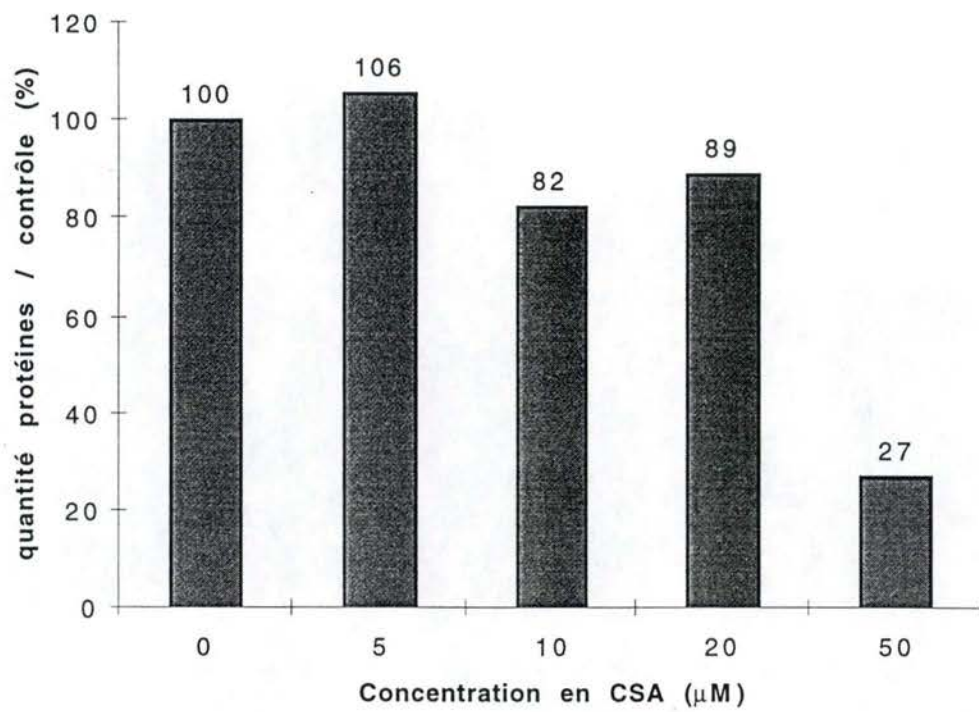


Figure III-17. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en cyclosporine A obtenue après dosage des protéines cellulaires.

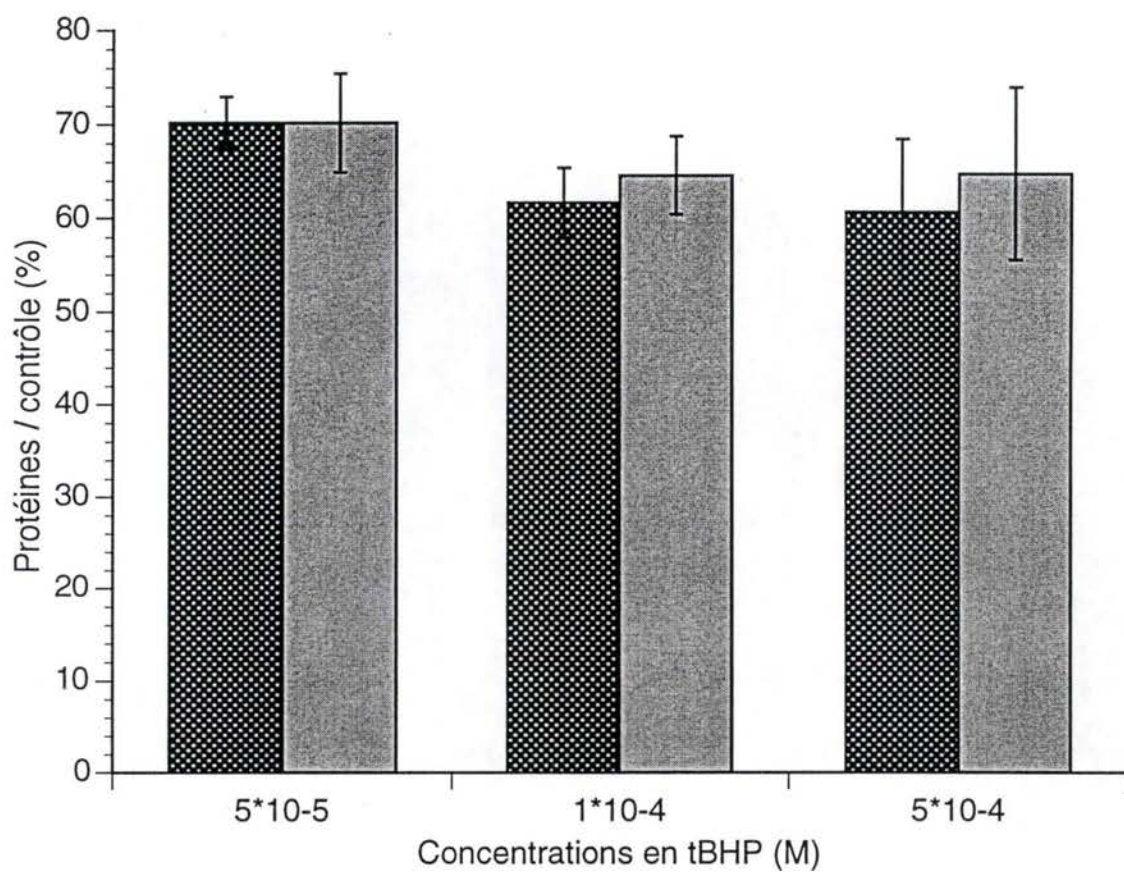


Figure III-18. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans cyclosporine A pendant le stress d'1 heure (noir: sans cyclosporine A, gris: avec cyclosporine A).

Afin d'étudier un rôle éventuel du relargage de calcium, nous avons réalisé des stress en présence de CSA.

2.5.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en cyclosporine A.

Nous avons testé la CSA en incubation d'une heure sous les concentrations suivantes: 5, 10, 20 et 50 μM .

La cyclosporine A est une molécule toxique pour les cellules à partir d'une concentration de 10 μM , avec une mortalité encore plus abondante à 20 et 50 μM (figure III-17.).

Il est donc primordial de l'utiliser à une concentration inférieure afin qu'elle ne cause elle-même aucune mortalité, qui serait mal interprétée dans les résultats du stress qui sera opéré ultérieurement.

Nous utiliserons la CSA à 5 μM en conditions de stress (voir mémoire de Licence d'A. Barez, FUNDP, 1997).

2.5.2. Stress au tBHP en présence de cyclosporine A et survie cellulaire.

2.5.2.1. Résultats.

Les pourcentages de survie, rapportés au contrôle, pour des stress sous les concentrations habituellement utilisées en tBHP, sont respectivement de 70,2; 61,7 et 60,7% sans CSA et de 70,2; 64,6 et 64,8% en présence de CSA (figure III-18.). Cette expérience a été répétée au moins quatre fois, toujours avec des résultats similaires.

2.5.2.2. Discussion.

On observe une similitude des valeurs de survie cellulaire lorsque celles-ci sont stressées en présence ou en absence de CSA. Un très faible effet protecteur est observé à 100 et 500 μM en tBHP. Cet inhibiteur ne semble donc pas protéger contre les stress de manière significative.

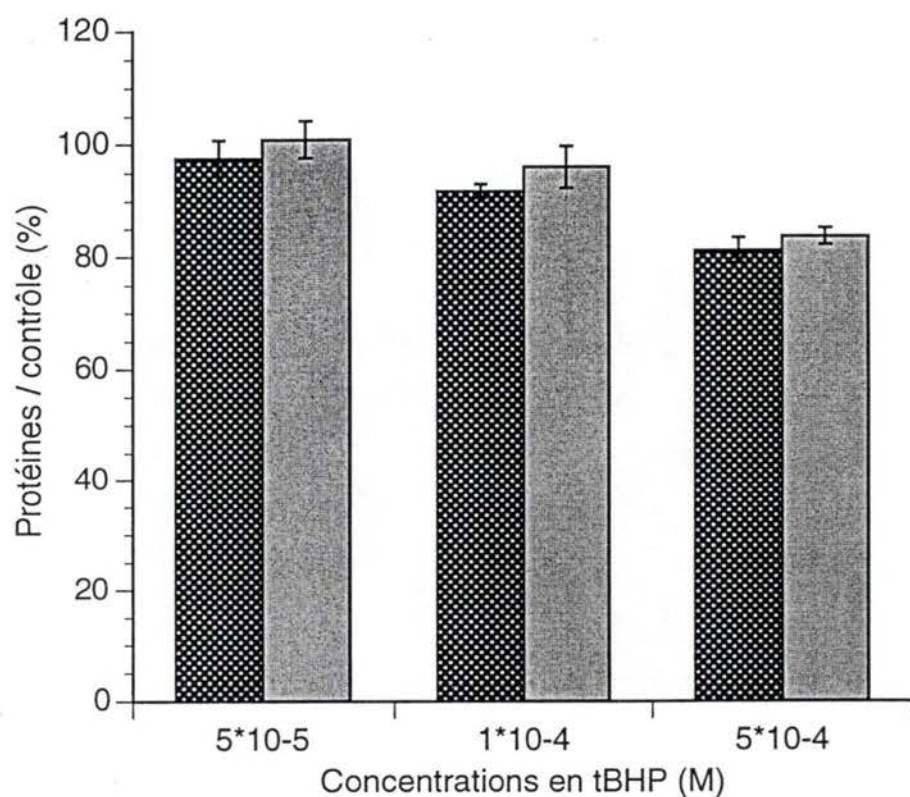


Figure III-19. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans préincubation de cyclosporine A pendant 4 heures (noir: sans cyclosporine A, gris: avec cyclosporine A).

2.5.3. Stress au tBHP avec préincubation de cyclosporine A et survie cellulaire.

Vu la très faible protection par la cyclosporine A dans les conditions de stress décrites ci-dessus, c'est-à-dire lorsque l'inhibiteur est uniquement ajouté au milieu pendant l'heure de stress, nous avons décidé de modifier le protocole.

Il s'agit ici de tester l'effet de la CSA après préincubation pendant un certain laps de temps avant de réaliser le stress. La littérature décrit des expériences avec une préincubation d'une demi-heure, ce qui n'a pas donné d'effet protecteur supplémentaire (non montré).

Nous choisissons enfin de préincuber la CSA pendant 4 heures afin de permettre une meilleure mise en évidence d'un effet protecteur éventuel.

2.5.3.1. Résultats.

Les pourcentages de survie, rapportés au contrôle, pour des stress sous les concentrations habituellement utilisées en tBHP, sont respectivement de 97,5; 91,7 et 81,2% sans CSA et de 100,9; 96,0 et 83,7% en présence de CSA préalablement incubée pendant 4 heures (figure III-19.).

2.5.3.2. Discussion.

Les faibles effets protecteurs de la CSA ne sont pas augmentés si l'on a réalisé des préincubations avec la CSA.

Des travaux précédents réalisés au laboratoire montraient des effets protecteurs par la cyclosporine dans des conditions de stress oxydatifs présentant des effets cytotoxiques beaucoup plus importants, tuant plus de 50% des cellules, et dus à l'emploi de concentrations en molécule stressante beaucoup plus élevées, s'éloignant très fortement de conditions oxydatives rencontrées dans un organisme. Par exemple, il existe des stress oxydatifs élevés lors d'intoxications inflammatoires ou de génération de radicaux libres dans les neurones à la suite d'activation de certains récepteurs dépendant du N-méthyl-D-aspartate, conduisant à une augmentation de Ca^{++} , puis à une activation de production radicalaire. Dans les expériences précédemment utilisées, les stress étaient réalisés dans un tampon et non dans un milieu de culture, qui est plus complexe au point de vue ionique etc., ce qui laisse à penser que ce phénomène de protection par la cyclosporine A ne s'observe que

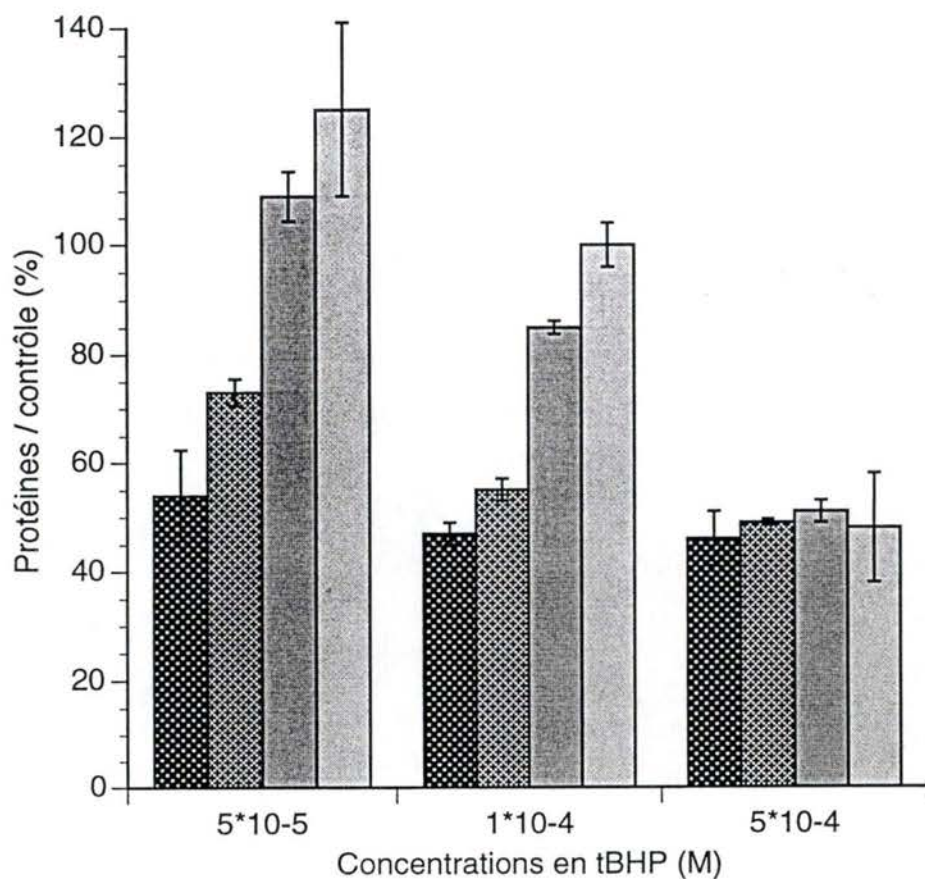


Figure III-20. Pourcentage de protéines obtenus pour différentes concentrations en tBHP avec ou sans cyclosporine A et/ou D-glucose (respectivement, dans l'ordre pour chaque intensité de stress: sans CSA ni D-glucose, avec CSA, avec D-glucose et avec CSA et D-glucose).

lorsque les cellules sont soumises à des stress radicalaires dans des conditions ioniques très défavorables et pour des stress très intenses.

Cependant, nous avons tenté d'expliquer ce manque de protection importante dans nos conditions expérimentales où les cellules sont stressées dans du tampon phosphate PBS sans calcium contenant 5 mM de D-glucose (figure III-20.). Des effets protecteurs significatifs de la cyclosporine ou du D-glucose seul sont retrouvés à 50 et 100 μ M en tBHP. Cependant, on ne peut distinguer de différence entre le pourcentage de survie à 50 μ M en tBHP avec D-glucose ou D-glucose + CSA, puisque les valeurs atteignent une valeur plafond de 100%, non significativement différente du contrôle 100%, aucun effet prolifératif de la CSA n'étant de plus connu. A 100 μ M en tBHP, on observe un effet additif du D-glucose et de la CSA, où l'on atteint 100%. Il faudrait tester des concentrations en tBHP entre 100 et 500 μ M pour savoir s'il existe un effet additif ou synergique du D-glucose et de la CSA.

Dans les conditions de cette expérience, il y a de l'ATP disponible pour faire fonctionner les pompes calciques de la membrane plasmique et rejeter le calcium entrant suite au stress oxydatifs, expliquant aussi les faibles effets protecteurs de la cyclosporine A. Des expériences peuvent être réalisées pour tester cette hypothèse: il suffit d'inhiber les pompes calciques de la membrane plasmique par des ions du vanadium. De plus, on pourrait tester le rôle du métabolisme énergétique de production d'ATP. On sait que la concentration en ATP diminue lors d'un stress sous tBHP réalisé à des concentrations semblables à celles que nous avons utilisées, dans un milieu sans glucose (Toussaint, O. *et al.*, 1994). Dans certaines conditions sans D-glucose et dans un tampon pauvre (PBS, sans Ca^{++}), on observe d'ailleurs un effet protecteur de la CSA (voir mémoire de Licence d'A. Barez, FUNDP, Namur, 1997). Il faudrait réaliser des stress sous tBHP en présence d'iodoacétate, qui inhibe la glycolyse, ou de découplants mitochondriaux et voir si la CSA peut offrir un effet protecteur. Une question qui resterait de toute façon en suspens serait de savoir comment il avait été possible, dans ces études précédentes, de trouver un effet protecteur de la CSA lors de stress réalisés dans un milieu sans Ca^{++} , du tampon phosphate salin (PBS) sans Ca^{++} en l'occurrence. Des stocks intracellulaires auraient-ils pu être libérés par d'autres organites puis repris par les mitochondries, expliquant un effet protecteur de la CSA?

Enfin, nous pouvons essayer différentes concentrations en cyclosporine A (CSA) pour voir si un effet protecteur apparaît à de plus hautes concentrations en CSA.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ces observations, serait que les fibroblastes utilisés pour ces expérimentations contiennent beaucoup moins de mitochondries que d'autres types cellulaires (neurones, hépatocytes, etc.) utilisés pour des études similaires. De ce fait, le cycle du calcium dans ces organites interviendrait pour une proportion minime dans les dommages causés à la cellule.

A ce stade de nos études, deux solutions s'offraient à nous. La première consistait en une longue mise au point visant soit à mesurer les échanges de calcium entre le milieu extracellulaire et la cytoplasme lors de stress réalisés sur le type cellulaire que nous avons utilisé, soit à mesurer la vitesse de capture du calcium et sa concentration atteinte dans les mitochondries. Une deuxième solution était d'aller voir ce qui se passe au niveau d'autres systèmes de régulation cellulaire faisant intervenir le Ca^{++} . Parmi ces voies, on trouve notamment une relation entre l'augmentation du Ca^{++} cytoplasmique et l'activation de la voie des Jun-kinases via la libération d'acide arachidonique (Madamanchi, N. *et al.*, 1998), ces kinases étant spécifiquement activées en condition de stress et pouvant conduire à l'apoptose des cellules stressées ou à leur meilleure survie, selon le type cellulaire d'intérêt.

C'est pour cela que, dans une première approche, nous avons voulu tester si un inhibiteur de la phospholipase A_2 , responsable de la libération d'acide arachidonique, pourrait modifier la survie cellulaire lors de stress sous tBHP.

2.6. Etude du rôle de l'activation de la PLA_2 par le calcium au moyen d'un inhibiteur placé dans le milieu de stress.

La phospholipase A_2 (PLA_2) est une enzyme activée en présence de Ca^{++} . Afin de déterminer dans quelle mesure son activité peut intervenir dans les mécanismes de réponse aux stress, nous avons utilisé un inhibiteur de la PLA_2 , la trifluoperazine. Cet inhibiteur intervient justement en empêchant l'activation de l'enzyme par le calcium.

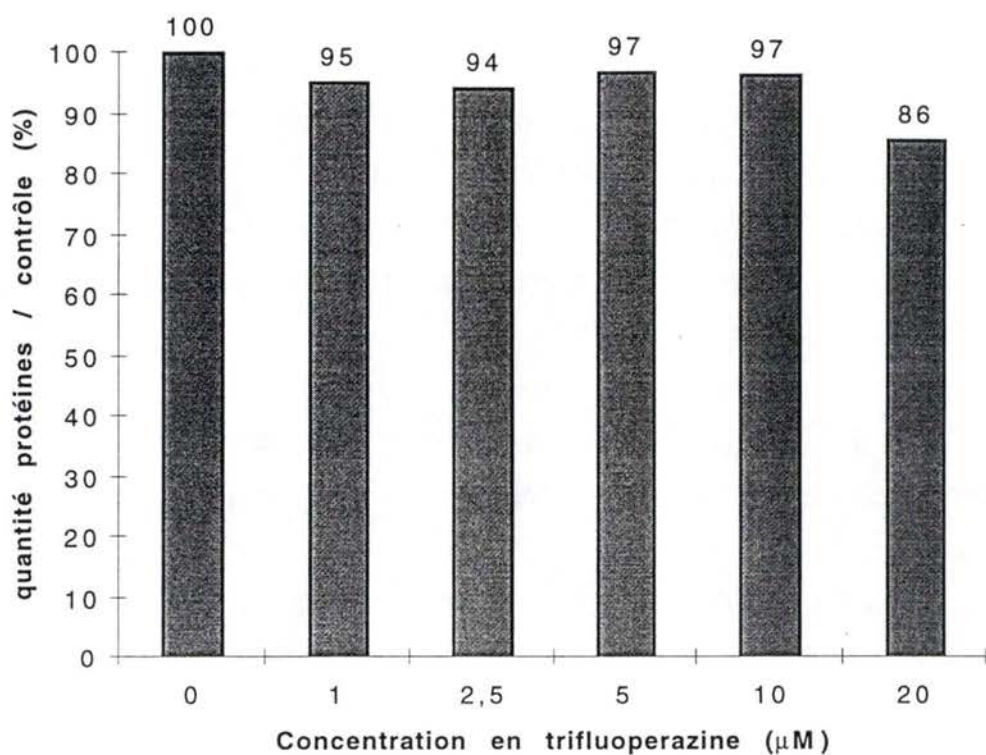


Figure III-21. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en trifluoperazine obtenue après dosage des protéines cellulaires.

2.6.1. Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en trifluoperazine.

La trifluoperazine a été incubée pendant 4 heures à des concentrations de 1; 2,5; 5; 10 et 20 μM . En présence des concentrations les plus faibles, le pourcentage de survie des cellules par rapport au contrôle reste proche de 100% (figure III-21.).

La survie est plus affectée par une concentration de 20 μM , la valeur chute en effet à 85,8% du contrôle.

2.6.2. Stress au tBHP avec préincubation de trifluoperazine et survie cellulaire.

Il a été déterminé que les inhibiteurs de PLA_2 doivent être incubés au moins 2 à 4 heures pour que l'inhibition soit effective, et détectable par un dosage d'acide arachidonique (Massom, L. *et al.*, 1990) (pour une revue, voir Glaser, K.B. *et al.*, 1993).

Nous avons choisi de préincuber la trifluoperazine à 10 μM pendant 4 heures avant de réaliser le stress.

2.6.2.1. Résultats.

Si l'on rapporte les résultats obtenus à leurs contrôles respectifs sans trifluoperazine à chaque concentration en tBHP, on trouve, respectivement 14,2; 20,7 et 12,4% de protection à 50, 100 et 500 μM de tBHP.

2.6.2.2. Discussion.

Bien que les résultats aillent dans le sens d'une protection de la part de la trifluoperazine aux trois intensités, pour être affirmatif il faudra réaliser l'expérience plusieurs fois.

Au moins deux explications peuvent nous éclairer quant au rôle protecteur de l'inhibiteur de la PLA_2 . Premièrement, la trifluoperazine empêche l'activation de l'enzyme et des voies métaboliques activées (cascade de l'acide arachidonique) par cette activation de la PLA_2 , ce qui permet une économie d'énergie (potentiel rédox, ATP) au sein de la cellule pendant le

stress. Cependant, une fois le stress terminé et l'inhibiteur ôté du milieu, la PLA₂ pourra à nouveau être active et notamment réparer les dommages causés à la membrane plasmique lors des stress oxydatifs.

Une seconde explication est que l'activation de la PLA₂ a des conséquences néfastes sur la survie cellulaire, en activant des voies métaboliques conduisant à la mort cellulaire. Dans certains types cellulaires, on observe que l'acide arachidonique libéré par la PLA₂ active la voie des Jun-kinases, ce qui a pour effet de déclencher le processus de mort cellulaire sans qu'on sache actuellement s'il s'agit de nécrose ou d'apoptose.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce mémoire, nous avons étudié deux types de comportements cellulaires, à savoir d'une part l'accélération du vieillissement par des stress d'intensité intermédiaire ou de stimulations par certaines cytokines et d'autre part la cytotoxicité des stress de forte intensité.

Premièrement, nous avons développé une méthode spectrophotométrique permettant de déterminer l'état de vieillissement d'une culture de fibroblastes après 1 à 3 stress successifs sous tBHP, sur base de l'activité SA β -gal à pH 6. Lors du vieillissement *in vitro* normal, nous avons aussi utilisé cette technique et l'on observe bien une augmentation de l'activité SA β -gal à pH 6 après lyse des cellules bien que le nombre de cellules par puits diminue lorsque les cellules proviennent de passages en culture avancés, donc lorsque les cellules sont vieilles.

Cette technique peut théoriquement être appliquée pour tester si de nombreux types de stress différents accélèrent ou non le vieillissement cellulaire. Donc ce test peut être utilisé pour savoir si une molécule pharmacologique donnée a des effets à long terme sur les cellules. Pour que ce test fonctionne après un nombre de stress plus élevé que 3, peut-être faudrait-il utiliser des solutions d'incubation fraîchement préparées puisque, par exemple, le pH de la solution est un facteur décisif.

Pour augmenter la sensibilité, nous pourrions aussi travailler avec un substrat fluorescent de la β -galactosidase et faire des lectures en fluorimétrie.

Deuxièmement, nous montrons que des stimulations successives à l'IL-1 α et au TNF- α ont un effet d'accélération du vieillissement des cellules, mesurable par différents biomarqueurs du vieillissement. Cet effet est également observé lors de stress oxydatifs successifs sublétaux, c'est-à-dire non cytotoxiques, réalisés sous tert-butylhydroperoxyde. Nous expliquons la similarité des résultats par le fait que dans les deux cas, les mécanismes de dommages causés aux cellules ont pour origine une production de radicaux libres. Cette hypothèse a été confirmée par les expériences réalisées en présence d'antioxydant.

Comment expliquer les différences obtenues avec IL-1 α et IL-1 β ?

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré que les cellules synoviales et des chondrocytes humains répondent différemment à l'IL-1 α et à l'IL-1 β . Knott *et al.* ont en effet montré que l'IL-1 β stimule plus efficacement le métabolisme de l'acide arachidonique par rapport à l'IL-1 α sans qu'il y ait pour autant de différences dans la nature des métabolites produits.

Cependant, la participation des cellules synoviales et des chondrocytes dans le processus inflammatoire fait penser que la réponse de ces cultures à l'IL-1 β soit typique des cellules intervenant dans les réactions inflammatoires, ce qui n'est pas le cas des fibroblastes où de telles différences ne sont pas observées sauf pour la production de la prostaglandine E_2 (Knott, I. *et al.*, 1993). Or, la prostaglandine E_2 inhibe la division des fibroblastes de poumon foetal. De plus, on sait qu'une cellule dont la mitose est inhibée répare beaucoup plus facilement ses dommages, d'où peut-être un effet moindre sur le vieillissement, que l'IL-1 α , qui n'a pas d'effet sur les mitoses (M. Burton, thèse de doctorat, FUNDP, 1997).

D'autres auteurs montrent qu'une incubation unique de fibroblastes en présence d'IL-1 α induit chez ceux-ci des changements transitoires, d'environ 4 heures, de la morphologie cellulaire suite à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de la voie des Jun-kinases (Zhu, P. *et al.*, 1998). Des résultats identiques ont été obtenus en incubant des cellules endothéliales en présence de TNF- α (P. d'Alezzio, communication personnelle). Les dommages cellulaires augmentant au fil des incubations, ces changements transitoires pourraient-ils devenir définitifs, expliquant les changements de morphotypes observés plus de 2 jours après la dernière incubation sous IL-1 α ?

On peut proposer un mécanisme commun entre les effets à long terme du TNF- α , de l'IL-1 α et du tBHP. Rosette et Karin ont montré que les stress radicalaires, le TNF- α et l'IL-1 α activent les récepteurs au TNF- α et à l'IL-1 α .

Comment les stress radicalaires activent-ils les récepteurs au TNF- α et à l'IL-1 α ? Dans cet article, Karin propose que les stress radicalaires pourraient modifier la structure tri-dimensionnelle de ces récepteurs. Toujours est-il que

les stress radicalaires induisent l'activation de ces récepteurs, ainsi qu'en atteste leur rassemblement en membrane (clustering), formant des mosaïques en microscopie confocale, en utilisant des anticorps spécifiques et fluorescents de ces récepteurs. De plus, on observe une activation de la voie des Jun-kinases dans ces incubations au TNF- α et à IL-1 α et lors de stress radicalaires (Rosette, C. et Karin, M., 1996). Un mécanisme commun d'action du TNF- α , de l'IL-1 α et du tBHP sur le vieillissement cellulaire pourrait passer par l'activation des Jun-kinases.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié la cytotoxicité des stress oxydatifs de forte intensité et le rôle du métabolisme calcique en réponse à ces stress. Des expériences de blocage de la voie métabolique du Ca^{++} par l'utilisation de divers composés inhibant cette voie à différents niveaux, nous pouvons tirer plusieurs conclusions.

Tout d'abord, l'absence de calcium dans le milieu de stress ne permet pas une meilleure survie des cellules. L'effet du Ca^{++} ne s'explique peut-être pas seulement en faisant référence à la voie métabolique qui nous intéresse. La présence ou l'absence de Ca^{++} extracellulaire pourrait aussi moduler toute une série de phénomènes complexes au niveau de la matrice extracellulaire et qui peuvent influencer la survie cellulaire. Ces mécanismes pourraient masquer un effet de la voie métabolique du Ca^{++} .

La deuxième étape fut de chélater le Ca^{++} intracellulaire. Une faible augmentation de la survie cellulaire face aux stress semble exister dans ce cas. Elle pourrait être due à une action sur le métabolisme mitochondrial mais des études plus poussées devraient être faites.

L'inhibition de la prise de Ca^{++} par la mitochondrie protège significativement les cellules pour certaines concentrations en tBHP. Il semble donc bien qu'un noeud important se situe au niveau de l'entrée de calcium dans la mitochondrie, organe remplissant le rôle de tampon envers la concentration accrue en calcium dans le cytosol.

Le réticulum endoplasmique est un autre organe responsable du stockage du calcium provenant du cytosol. L'inhibition de l'entrée de calcium dans le réticulum endoplasmique lors des stress a pour effet de diminuer faiblement la survie des cellules. Ceci ne fait qu'aller dans le sens d'un rôle effectif du métabolisme calcique mitochondrial dans la réponse aux stress, car

un défaut dans la prise de Ca^{++} cytosolique par le réticulum endoplasmique peut conduire à une augmentation du rôle de tampon à jouer par la mitochondrie.

Enfin, la cyclosporine A, inhibiteur du relargage de Ca^{++} par la mitochondrie après le stress, n'a eu aucun effet de protection. Lorsqu'on compare les résultats obtenus précédemment au laboratoire, une grande variante de nos expériences consiste en la réalisation de stress à des concentrations en tBHP un peu inférieures, en général de 50 à 500 μM par rapport à 50 à 5000 μM , et dans du milieu de culture, ce qui n'était pas le cas auparavant. Le milieu de culture est beaucoup plus riche en ions, D-glucose, acides aminés, etc., et permet donc aux cellules une réponse plus adéquate au stress par rapport aux tampons HBSS ou PBS. Dans ces conditions de stress améliorées, la cyclosporine A aurait donc une moins grande participation à la survie cellulaire. Ceci tranche avec la plupart des études où l'on teste la cyclosporine A soit sur des mitochondries purifiées, donc sans tout le système cellulaire qui tamponne le calcium, soit sur des cellules stressées dans un tampon pauvre en ions et en substrats énergétiques. Il a d'ailleurs, par le passé, été démontré au laboratoire que le D-glucose, ajouté à un tampon PBS permettait une survie cellulaire nettement plus importante, à l'opposé du L-glucose qui ne procurait aucune protection. Des effets similaires ont été trouvés en présence de pyruvate (Toussaint, O. *et al.*, 1994). Dans ce travail, nous avons pu reproduire l'effet protecteur spectaculaire du D-glucose. Néanmoins, est-ce qu'un effet protecteur par la cyclosporine peut être obtenu en présence de D-glucose? Nous avons effectué une expérience de stress sous tBHP où les cellules étaient stressées dans du PBS. Dans ces conditions, nous avons observé une faible protection procurée par la cyclosporine A, bien que celui-ci fût supérieur à celui observé lors de stress sous tBHP réalisés dans du milieu de culture. Le D-glucose seul permettait une très bonne protection. Lorsque la cyclosporine A était ajoutée au D-glucose, la protection par la cyclosporine était encore visible, mais il n'est pas clair que cette effet soit additif ou synergique. Donc, ce n'est pas la présence de D-glucose du milieu de culture qui empêcherait la protection par la cyclosporine mais bien la présence des nombreux ions et acides aminés entrant dans la composition du milieu de culture. Une étude systématique pourrait être envisagée où l'on testerait les

effets simples ou combinés des différents constituants du milieu de culture. Lorsque les stress sont réalisés dans du milieu de culture, d'une part le glucose permet à la cellule de régénérer de l'ATP et du NADPH. L'ATP peut alors servir aux pompes à calcium de la membrane plasmique, ce qui diminue l'effet du stress sur le pompage du calcium par les mitochondries. Sans ce calcium mitochondrial, le NADPH peut servir à générer le glutathion réduit. De plus, la cystéine présente dans le milieu de culture peut participer à la synthèse de glutathion réduit *de novo*, tout ceci expliquant d'ailleurs une meilleure survie cellulaire lorsque le stress est réalisé dans du milieu de culture.

Dans cette optique, l'effet de protection procurée par le Ruthenium Red peut s'expliquer, mais de manière inattendue au départ des expériences. En effet, on aurait pu croire que le Ruthenium Red protégerait en limitant l'accumulation de Ca^{++} dans les mitochondries et donc en limitant la libération ultérieure et brutale de Ca^{++} en retour, dans le cytoplasme. Comme on n'observe pas d'effet protecteur de la cyclosporine lorsque les stress sont réalisés dans du milieu de culture, cet effet de limitation de la libération ultérieure de Ca^{++} ne semble pas exister. Par contre, on sait que l'élévation faible mais constante du Ca^{++} intra-matriciel peut conduire à une inhibition de la respiration et donc de la régénération d'ATP. Le Ruthenium Red pourrait protéger contre cette inhibition de la régénération d'ATP en empêchant le Ca^{++} d'entrer dans les mitochondries. Cette lutte contre une perte de capacité de régénération de l'ATP pourrait aussi expliquer pourquoi les cellules ont mis au point un système de relargage brutal du Ca^{++} s'accumulant dans les mitochondries lors de stress subis dans des conditions très défavorables: d'une part, les mitochondries pourraient jouer brièvement un rôle de tampon de la concentration calcique intracytoplasmique, puis libérer ce Ca^{++} pour assurer la respiration cellulaire. De plus, rien ne dit que les cycles de pompage / libération de Ca^{++} par les mitochondries se fassent en même temps, de manière synchronisée pour toutes les mitochondries.

Il faudrait aussi s'assurer du fait que le système de libération du calcium qui peut être inhibé par la cyclosporine A existe dans les fibroblastes que nous avons utilisés lors de cette étude, ce qui sort largement du cadre d'un mémoire de licence.

Pour que le Ruthenium Red protège, il faut néanmoins que du calcium entre en excès dans le cytoplasme lors des stress. Dans cette optique, le Ruthenium Red empêcherait le pompage mitochondrial de calcium en attendant que les pompes calciques de la membrane plasmique rejettent le Ca^{++} hors de la cellule. L'effet de protection par le BAPTA-AM va dans ce sens, c'est-à-dire qu'il y aurait une accumulation de calcium dans le cytoplasme même si elle n'est pas très importante.

Cette étude devra donc être complétée par la détermination des modifications de la concentration en calcium intracytoplasmique ou intramatriciel.

De plus, la présence de ce Ca^{++} intracytoplasmique expliquerait aussi la modification du pourcentage de survie cellulaire observée lorsque la PLA_2 , activable par le Ca^{++} , est inhibée, d'autant plus que la PLA_2 agit au niveau de la membrane plasmique, lieu d'entrée du Ca^{++} (Madamanchi, N. *et al.*, 1998).

Notre étude du métabolisme calcique en réponse aux stress a été parachevée par l'étude de l'inhibition de la phospholipase A_2 , enzyme normalement activée en présence de calcium. Son inhibition semble favoriser la survie cellulaire. Par l'activation de la cascade de l'acide arachidonique, la PLA_2 pourrait avoir un effet néfaste sur les cellules, en déclenchant le mort cellulaire, ce qui a déjà été observé via une activation des Jun-kinases. Il s'agit de kinases spécifiquement activées par une phosphorylation lors de stress (SAPK, stress activated protein kinases), et qui peuvent déclencher l'apoptose des cellules.

Nous avons déjà testé précédemment au laboratoire si les cellules stressées sous tBHP mouraient par apoptose et par nécrose et nous n'avons jamais trouvé que de rares cellules en apoptose. Deux explications peuvent ici nous aider à comprendre ce qui se passe. Premièrement, il est clair qu'aux doses très élevées en tBHP, la cellule n'a pas le temps de déclencher un programme d'apoptose. Le niveau de dommages est si élevé que les cellules meurent de suite par nécrose. Deuxièmement, il est possible que les cellules qui meurent lors des stress plus faibles ne meurent pas par nécrose mais par apoptose. Cependant, un problème pour détecter les cellules en apoptose est que

les cellules destinées à l'apoptose pourraient très bien se détacher de leur substrat avant de déclencher l'apoptose, ce qui expliquerait que l'apoptose ne serait que rarement observée sur les cellules restées attachées. Dans ce cas, les cellules en apoptose seraient perdues lors de la décantation du milieu de culture. Lors de stress au tBHP, on remarque, à la fin des stress, que des cellules flottent dans le milieu, et pourraient correspondre à ces cellules en apoptose. Ruoslathi a proposé, dans *Science* en 1997, que les cellules endothéliales qui perdent le contact avec leur matrice extracellulaire peuvent déclencher l'apoptose, via une modification de la transduction du signal envoyé par les intégrines, notamment lorsque ces dernières perdent le contact des motifs RGD de la fibronectine (Ruoslahti, E., 1997). Un phénomène comparable pourrait avoir lieu chez les fibroblastes.

Un argument en faveur de cette hypothèse est fourni par des expériences de stress sous H_2O_2 réalisés sur des fibroblastes, et où il existe trois phénomènes distincts de mortalité. Au-dessus de 10 mM, il y a nécrose. A 10 et 5 mM, il y a apoptose. A 0,5 et 0,1 mM, il y a une mortalité décalée dans le temps jusqu'à 24 heures, avec une inhibition de cette mortalité par un inhibiteur de l'apoptose, l'aminobenzoamide. En outre il n'y a pas, dans ce type de mortalité, de possibilité de détection de court fragments d'ADN, caractéristiques de l'apoptose (Gardner, A.M. *et al.*, 1997). Ce défaut de détection est probablement dû au détachement progressif de ces cellules de leur substrat, et dilution de l'ADN dans le milieu qui est ensuite retiré.

Notons qu'une très grande partie de la mortalité due au tBHP s'étale aussi dans le temps, ce qui explique pourquoi nous dosons toujours les protéines cellulaires 24 heures après le stress, car aucune différence n'est observée juste après le stress, lorsqu'il est effectué à des concentrations en tBHP inférieures à 500 μ M.

Gardner *et al.* ont de plus montré que la surexpression de Bcl-2 suite à sa transfection permettait d'empêcher la mortalité décalée observée à 0,5 et 0,1 mM. D'autres auteurs ont montré que Bcl-2 pouvait favoriser d'une part un effet antioxydant indirect en empêchant une explosion de la production radicalaire déclenchée par les mitochondries ou, d'autre part, l'importation de la protéine p 53 dans le noyau. On sait que la protéine p 53 déclenche l'apoptose dans de nombreux types cellulaires lors de dommages radicalaires à l'ADN.

Bcl-2 est en effet présente dans les membranes mitochondriales et dans l'enveloppe nucléaire (Beham, A. *et al.*, 1997).

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K. et Albiez, M. Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5112-5116, 1988
- Beham, A., Marin, M. C., Fernandez, A., Hermann, J., Brisbay, S., Tari, A. M. et McDonnell, T. J. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* **15**, 2767-2772, 1997
- Chang, J., Musser, J. H. et McGregor, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2429-2436, 1987
- Cutler, R. G. Dysdifferentiation and aging. In : Molecular biology of aging: gene stability and gene expression. Sohal, R. S., Birnbaum, L. & Cutler, R. G., Eds. 307-340, Raven Press, New York, 1985
- Cutler, R. G. Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **12**, 75-98, 1991
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. et Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367, 1995
- Dinarello, C. A. The interleukin-1 family : 10 years of discovery. *FASEB J.* **8**, 1314-1325, 1994
- Fairley, J. A. Intracellular targets of cyclosporine. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23**, 1329-1337, 1990
- Gardner, A. M., Xu, F.-H., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y. et Lichtenstein, A. Nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 73-83, 1997
- Glaser, K. B., Mobilio, M., Chang, J. Y. et Senko, N. Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmaceut. Sci.* **14**, 92-98, 1993
- Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300, 1956
- Harman, D. Extending functional life span. *Exp. Gerontol.* **33**, 95-112, 1998
- Hayflick, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **31**, 614-636, 1965
- Hayflick, L. et Moorehead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell stains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621, 1961
- Kanungo, M. S. *Biochemistry of aging*. Academic Press, New-York, 1980

- Kirkwood, T. B. L. et Cremer, T. Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Human Genetics* **60**, 101-121, 1982
- Knott, I., Dieu, M., Burton, M., Lecomte, V., Remacle, J. et Raes, M. Differential effects of interleukin-1 alpha and beta on the arachidonic acid cascade in human synovial cells and chondrocytes in culture. *Agents Action* **39**, 126-131, 1993
- Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951
- Madamanchi, N., Budoski, R. D., Runge, M. S. et Rao, G. N. Arachidonic acid activates Jun N-terminal kinase in vascular smooth muscle cells. *Oncogene* **16**, 417-422, 1998
- Massom, L., Lee, H. et Jarrett, H. W. Trifluoperazine binding to porcine brain calmodulin and skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* **23**, 671-681, 1990
- Mayer, R. J. et Marshall, L. A. New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonoyl-selective and non-selective enzymes. *FASEB J.* **7**, 339-348, 1993
- Meier, B., Cross, A. R., Hancock, J. T., Kaup, F. J. et Jones, O. G. T. Identification of a superoxide generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem.* **275**, 241-245, 1991
- Orgel, L. E. The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 517-521, 1963
- Orgel, L. E. Ageing of clones of mammalian cells. *Nature* **243**, 441-445, 1973
- Petronilli, V., Nicolli, A., Costantini, P., Colonna, R. et Bernardi, P. The permeability transition pore. Pathophysiology of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel In : Modern trends in biothermokinetics. vol: 3 Gnaiger, E., Ed. 259-262, Innsbruck, 1994
- Poot, M. Oxidant and antioxidant in proliferative senescence. *Mut. Res* **256**, 177-190, 1991
- Remacle, J., Raes, M., Corbisier, P., Pigeolet, E., Michiels, C., Houbion, A. et Lambert, D. A tentative unification of cellular theories of ageing In : The theoretical basis of aging research. Robert, M. & Hofecker, G. 83-90, Wien, 1990
- Renard, P., Zachary, M.-D., bougelet, C., Mirault, M. E., Haegeman, G., Remacle, J. et Raes, M. Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-induced nuclear factor kappa B activation. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 149-160, 1997
- Richter, C. et Schweizer, M. Oxidative stress in mitochondria In : Oxidative stress and molecular biology of antioxydant defenses. 169-200, Cold Spring, 1997
- Rosette, C. et Karin, M. Ultraviolet light and osmotic stress : activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptor. *Science* **274**, 1194-1197, 1996

- Ruoslahti, E. Stretching is good for a cell. *Science* **276**, 1343-1346, 1997
- Slagboom, P. E. et Vijg, J. Genetic instability and aging: theories, facts, and future perspectives. *Genome* **31**, 373-385, 1989
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J. et Sevanian, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 269-285, 1997
- Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 209-220, 1994
- Toussaint, O., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C. et Remacle, J. Failures to increase the maximum *in vitro* life-span of human fibroblasts and some theoretical justifications. Experimental arguments in favour of the concept of critical threshold of error accumulation. In : Modification of the rate of aging. Ruiz-Torres, A. & Hofecker, G., Eds 25-32, Wiener Verlag, Wien, 1992
- Toussaint, O., Raes, M. et Remacle, J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech. Ageing Dev.* **61**, 45-64, 1991
- Toussaint, O. et Remacle, J. Arguments en faveur du concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs dans la mort cellulaire. Qualités et limites de ce concept dans le vieillissement cellulaire. *Pathol. Biol.* **42**, 305-311, 1994
- Waite, M. Phospholipases In : Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Vance, D. E. & Vance, J. E., Eds Elsevier, 222-231, Amsterdam, 1996
- Wong, G. H., Elwell, J. H. et Goeddel, D. V. Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**, 923-931, 1989
- Zhu, P., Xiong, W., Rodgers, G. et Quarnstorm, E. E. Regulation of interleukin 1 signaling through integrin binding and actin reorganization : disparate effects on NF-kappaB and stress kinase pathways. *Biochem. J.* **330**, 975-981, 1998

BUMP



0 0 7 8 4 6 0 4 6

***FM B04/1998/02**

